



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

**EXERCÍCIO FÍSICO PATERNO: EFEITOS NO DESEMPENHO FÍSICO E
COGNITIVO DA PROLE**

Dissertação de Mestrado

Filipe Mega dos Santos

Porto Alegre
2017

Filipe Mega dos Santos

**EXERCÍCIO FÍSICO PATERNO: EFEITOS NO DESEMPENHO FÍSICO E
COGNITIVO DA PROLE**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Neurociências da Universidade
Federal do Rio Grande do Sul como
requisito parcial para a obtenção do
grau de Mestre.

Orientadora: Prof.^a Dra. Simone
Marcuzzo

Porto Alegre

2017

Dedico esta dissertação à minha amada, Michele.

AGRADECIMENTOS

- Mais uma vez demonstro minha gratidão à minha mulher, Michele Sampedro Ramos, por todo o suporte, por ter entrado na minha vida em um momento tão importante e participado ativamente do meu crescimento profissional e pessoal, fazendo, não só do meu conhecimento, mas também da minha história, algo muito maior desde o dia em que nos conhecemos;
- À minha orientadora, Prof.^a Dra. Simone Marcuzzo, por todos os ensinamentos, pela amizade, paciência e confiança nessa caminhada;
- Ao meu grupo, PND: Christiano Spindler, André Meireles, Ethiane Segabinazi, Francele Piazza e Gabriela Salvalaggio, pelo trabalho em equipe, pela amizade, pela troca de conhecimento e também pelos momentos fora do laboratório;
- Aos amigos do laboratório de Histofisiologia Comparada: Heloísa Confortim, Bruna Ferrary, Patrícia Miguel e Silvia Barbosa, pelo companheirismo. Agradecimento especial a Heloísa, que, além da amizade fraterna que cultivamos, participou nos experimentos. Também à Louisiana Meireles, pela amizade e grande ajuda e incentivo para o início desta fase. E às colegas do PPG Neurociências, Mirelle Casagrande e Francine Dalpian, pela amizade e parceria;
- Ao Eurico Antunes, pela amizade, parceria e importância que teve nesse meu projeto em Porto Alegre;
- À minha sogra, Rejane Sampedro, pela torcida, apoio, disponibilidade e impecabilidade na revisão do material em língua inglesa;
- À banca avaliadora, pelas sugestões e disponibilidade;
- À CAPES, pela bolsa de estudos e financiamento da pesquisa;

- Ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências da UFRGS, pela oportunidade de estudo.
- Por fim, agradeço de forma coletiva, a muitas pessoas, amigos e familiares, que não fizeram parte, de forma direta, deste projeto que tracei para a minha formação, deste mestrado, mas que, de alguma forma, foram importantes na minha vida, no meu crescimento pessoal, meu muitíssimo obrigado.

“Grandes homens não nascem grandes, tornam-se grandes. ”

The Godfather

RESUMO

A prática de exercício físico de mulheres nos períodos de concepção e gestação causa uma série de efeitos benéficos no desenvolvimento da prole. Pouco se sabe, no entanto, sobre a influência do exercício físico masculino sobre seus descendentes. Como a espermatogênese é um processo contínuo, as experiências de vida dos pais poderiam reprogramar o genoma dos espermatozoides por meio de processos epigenéticos, por exemplo, que poderiam interferir no desenvolvimento da prole. A presente dissertação tem como objetivo estudar essa hipótese. Examinamos os efeitos do exercício físico paterno sobre os seguintes parâmetros de desenvolvimento da prole: maturação corporal, desempenho cognitivo, expressão do BDNF muscular, no hipocampo e córtex frontal; e metilação global do DNA no hipocampo. Para tanto, ratos Wistar machos foram divididos em dois grupos: sedentários e exercitados. O protocolo de exercício físico consistiu de corrida na esteira por um período de 8 semanas. Após, os animais foram expostos às fêmeas em período fértil e não-treinadas. Os filhotes de ambos os grupos de pais foram submetidos a testes para avaliação do ganho de peso e medidas de crescimento, do primeiro dia pós-natal (P1) até o P21. A partir do P46, foram realizadas a medida indireta do consumo máximo de oxigênio e a avaliação da aprendizagem espacial e memória, até o P52. Os animais foram submetidos à eutanásia; os músculos dos membros posteriores, os testículos, as glândulas adrenais e a gordura gonadal foram pesados. Os resultados mostram que a prole de pais treinados e de não-treinados não diferem quanto às medidas físicas, desempenho físico, avaliação cognitiva e expressão do fator trófico. No entanto, houve uma diminuição significativa no peso dos testículos e da gordura gonadal na prole de pais treinados. O nível de metilação do DNA no hipocampo de filhos de pais exercitados apresentou uma diminuição, comparada ao grupo de filhos de pais sedentários. Esse resultado aponta para uma maior expressão gênica no grupo exercitado. Embora no presente estudo os mecanismos pelos quais o exercício paterno influencia o desenvolvimento da prole não tenham sido estabelecidos, reforça-se o papel essencial que a atividade física tem em um estilo de vida saudável e na prevenção de doenças, além de não gerar prejuízos ao desenvolvimento dos descendentes.

ABSTRACT

The physical exercise of women in the pre-conception and gestation periods causes a series of beneficial effects on offspring development. Little is known, however, about the influence of male physical exercise on their offspring. As spermatogenesis is a continuous process, the life experiences of the fathers could reprogram the sperm genome by means of epigenetic processes, for example, which could interfere in the development of the offspring. The present dissertation aims to study this hypothesis. We examined the effects of paternal physical exercise on the following parameters of offspring development: body maturation, cognitive performance, hippocampus, cortex and muscle BDNF expression, and global DNA methylation in the hippocampus. Thus, male Wistar rats were divided into two groups: sedentary and exercised. The physical exercise protocol consisted of running on the treadmill for a period of 8 weeks. Afterwards, the animals were exposed to females at a fertile and untrained. The pups of both groups of parents were submitted to tests to evaluate the weight gain and growth measures from the first postnatal day (P1) to P21. From P46, the indirect measurement of maximum oxygen consumption and the evaluation of spatial learning and memory were made until P52. The animals were submitted to euthanasia; the muscles of the hindlimbs, the testicles, the adrenal glands and the gonadal fat were weighed. The results showed that the offspring of trained and untrained fathers did not differ in physical measures, physical performance, cognitive evaluation and trophic factor expression. However, there was a significant decrease in testicles weight and gonadal fat in the offspring of trained parents. The level of DNA methylation in the hippocampus of pups of exercised fathers presented a decrease, compared to the group of pups of sedentary fathers. This result points to a greater gene expression in the exercised group. Although in the present study the mechanisms by which paternal exercise influences the development of the offspring have not been established, the essential role that physical activity has in a healthy lifestyle and in the prevention of diseases is reinforced, and it does not cause the offspring development any harm as well.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Língua Portuguesa

BDNF.....	Fator Neurotrófico Derivado do Encéfalo
DNA.....	Ácido desoxirribonucleico
GR.....	receptores de glicocorticoide
HHT.....	Hipotálamo-hipófise-testículos
miRNAs.....	microRNAs
RNA.....	Ácido Ribonucleico
ROS.....	espécies reativas de oxigênio
VO ₂	medida indireta de consumo de oxigênio
VO ₂ máx.....	Consumo Máximo de Oxigênio

Língua Inglesa

ACOG.....	American College of Obstetrician and Gynecologists
DOHaD.....	Developmental Origins of Health and Disease
P.....	Postnatal day

ARTIGO

BDNF.....	Brain-derived neurotrophic factor
cm.....	Centimeters
DNA.....	Deoxyribonucleic acid
EXE.....	Exercised group
EGTA	Egtazic acid
G.....	Gestational day
h.....	Hours
m/mim.....	Meters per minute
min.....	Minutes
miRNAs.....	microRNAs
ml.....	Milliliter
mm.....	Millimeter

mM.....	Milimolar
μl.....	Microliter
ng.....	Nanograms
nm.....	Nanometer
° C.....	Degrees Celsius
P.....	Postnatal day
p.....	p value
pg.....	Picograms
PMSF.....	phenylmethysulfonyl fluoride
SED.....	Sedentary group
SEM.....	Standard error of mean
VO ₂	Indirect measurement of Oxygen
VO ₂ máx.....	Maximum Oxygen Consumption

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Experiências maternas como, por exemplo, subnutrição, exposição ao estresse crônico ou infecções podem alterar o metabolismo materno, levando a um prejuízo da funcionalidade da placenta, o que, por sua vez, pode modificar a transmissão de fatores de crescimento e nutrientes. Dessa maneira a programação epigenética de células somáticas e germinativas da prole é modificada, podendo influenciar o seu fenótipo, ou ainda, de uma próxima geração. Modificado de Bale (2015). 2

Figura 2. Três tipos básicos de efeito paterno influenciando a prole (mediados em graus variados pelas respostas maternas): (A) Efeito Pós-natal. Nas espécies onde os machos interagem diretamente com seus descendentes, os efeitos paternos podem ocorrer diretamente em sua prole, podendo envolver influências comportamentais no desenvolvimento dos filhotes. (B) Fertilização externa. Os efeitos paternos podem ocorrer através de influências masculinas nos ovos fora do corpo da fêmea, podendo ser mediados por fatores transmitidos por esperma ou ejaculação, ou por secreções de glândulas somáticas. (C) Fertilização interna. O fenótipo masculino pode influenciar o corpo feminino, podendo se manifestar como um efeito sobre o desenvolvimento da prole. Esses efeitos podem ser mediados pela alocação diferencial feminina de recursos totais, ou pela alocação relativa para diferentes traços da prole ou componentes de desenvolvimento. Em muitos casos, será difícil determinar como o efeito é mediado e se representa uma estratégia masculina, feminina, ou uma combinação de ambos. Modificado de Crean & Bonduriansky (2014).7

Figura 3. Desenho esquemático evidenciando que a exposição paterna a diversos fatores ambientais previamente à concepção pode transmitir informação às próximas gerações via alterações epigenéticas em células germinativas. Modificado de Curley et al. (2011).8

Figura 4. Metilação do DNA: ocorre quando os grupos metil 'marcam' o DNA e ativam ou reprimem a expressão gênica. O silenciamento de uma atividade genética pode ocorrer se a molécula de hidrogênio (H) da citosina for substituída por um grupo metil (Me) no promotor de um gene. Histonas: são proteínas em torno das quais o DNA pode sofrer compactação, e a modificação das histonas pode regular a atividade gênica. Modificado de Brown (2015).11

Figura 5. Provável mecanismo pelo qual o exercício físico induz modificações epigenéticas nos espermatozoides. O exercício físico influencia o metabolismo e o eixo HHT na geração F0, que, por sua vez, alteram as marcas epigenéticas no período da espermatogênese. Metilação de DNA, modificação de histonas e dos níveis de RNAs não codificantes nos espermatozoides são as alterações epigenéticas mais importantes que podem causar uma mudança fenotípica na prole. Modificado de Murachov et al. (2016).12

Figura 6. Na maioria dos mamíferos, a espermatogênese dura cerca de 6 a 8 semanas. No decorrer desse período, a linhagem germinativa encontra-se suscetível a fatores ambientais que podem modular as suas marcas epigenéticas e, por sua vez, modificar o fenótipo da prole. Adaptado de Bale, 201513

ARTIGO

Figure 1. Progenitors indirect maximum VO_2 measurement. The left bars showed that the basal VO_2 before the training there were not significant differences between the groups. *The right bars showed a difference between the sedentary and exercise group ($p = 0.001$). **It was observed a difference in time to fatigue between the exercise group before and after the exercise ($p = 0.001$). SED, sedenrary group; EXE, exercised group. Independent and paired samples t-test. Values are means \pm SE, $n = 10/\text{group}$39

Figure 2. Latency to find the plataform at trials days. *Decrease of time to found the plataform between the day 1 and 2 in both groups ($p = 0.01$). **Difference between

the day 1 compared to the others days in both groups ($p = 0.00$). SED, sedentary group; EXE, exercise group; T, trial. Repetead Measures ANOVA. Values are means \pm SE, $n = 20/\text{group}$40

Figure 3. (A) Latency to find the plataform at test day. (B) Targe and opposite quadrants occupancy at test day. No signifificant differences in both measurements. SED, sedentary group; EXE, exercise group; T, trial. Independent t-test. Values are means \pm SE, $n = 20/\text{group}$40

Figure 4. (A) Gonadal weight index, $^*(p = 0.013)$. (B) Gonadal weight fat index, $^*(p = 0.026)$. SED, sedentary group; EXE, exercise group. Independent t-test. Values are means \pm SE, $n = 33 - 38$41

Figure 5. Global hippocampal DNA methylation. SED, sedentary group; EXE, exercised group. Independent t-test, $^*(p = 0.001)$. Values are percentagem \pm SE, $n = 6/\text{group}$41

LISTA DE TABELAS

ARTIGO

Table 1. Mean body mass, growth measurements, voluntary physical activity and indirect oxygen consumption in offspring of sedentary and exercise fathers.42

Table 2. Weight indexes of organs and muscle and brain structures levels of BDNF.43

SUMÁRIO

RESUMO	VII
ABSTRACT	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	IX
LISTA DE FIGURAS	XI
LISTA DE TABELAS	XIV
SUMÁRIO	XV
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 INFLUÊNCIA DOS FATORES PRÉ-CONCEPCIONAIS NOS DESFECHOS DA PROLE	1
1.2 INFLUÊNCIA MATERNA NA PROLE	1
1.2.1 Interferências negativas	1
1.2.2 Interferências positivas e o exercício materno	3
1.3 INFLUÊNCIA PATERNA NA PROLE	6
1.4 Epigenética	10
2. JUSTIFICATIVA.....	15
3. OBJETIVOS	16
3.1 OBJETIVO GERAL	16
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
4. MÉTODOS, RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
4.1 ARTIGO: Paternal Physical Exercise Alters the Hippocampal DNA Methylation without Modify the Development of the Progeny	17
5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	44
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

1. INTRODUÇÃO

1.1 INFLUÊNCIA DOS FATORES PRÉ-CONCEPCIONAIS NOS DESFECHOS DA PROLE

Estudos epidemiológicos relacionam a influência de fatores ambientais no início da vida com mudanças na expressão da carga gênica do indivíduo, determinando o padrão saúde-doença da prole. Tais ideias abrangem um ramo de conhecimento científico chamado de “origens fetais da saúde e da doença dos adultos” (DOHaD, do inglês *Developmental Origins of Health and Disease*) (Silveira et al., 2007). Essa área de conhecimento estuda como o início da vida é influenciado por fatores parentais e ambientais, induzindo ajustes metabólicos precoces na prole, que são determinantes de desfechos ao longo da vida. Esta programação do organismo dos descendentes ocorre tanto negativamente, induzindo o desenvolvimento de doenças na vida adulta, como positivamente, prevenindo o desenvolvimento das mesmas. Ou seja, o conceito DOHaD sugere que o ambiente ao qual um organismo é exposto, incluindo os períodos pré-natal e início da vida, pode gerar consequências duradouras para a saúde. Portanto, intervenções benéficas nessas janelas de tempo poderiam reduzir os riscos e também limitar a transmissão de doenças para a próxima geração (Ravelli & Stein, 1976; van Os & Selten, 1998; Silveira et al., 2007; Rosa et al., 2013).

As pesquisas em DOHaD possuem implicações substanciais para as sociedades em transição e para a política de saúde global. Contudo, o foco dos estudos inclina-se mais para a investigação sobre os efeitos de fatores adversos e pouco se sabe sobre estratégias que beneficiem a saúde (Wadhwa et al., 2009). Há uma lacuna de conhecimento acerca do H (*health*) da sigla DOHaD, sendo menos explorado na pesquisa, em termos de prevenção de doenças, intervenções nutricionais e exercício físico, dentre outras intervenções positivas, por exemplo.

1.2 INFLUÊNCIA MATERNA NA PROLE

1.2.1 Interferências negativas

Estudos em animais e humanos mostram que exposições maternas (tanto no período periconcepcional, quanto gestacional) a uma variedade de fatores

quanto o sobrepeso durante a gestação, resultam em maturação reprodutiva precoce em filhotes fêmeas (Rosa et al., 2013).

Além de aspectos nutricionais, o consumo materno de álcool durante a gravidez está associado a uma grande variedade de anomalias na prole, incluindo alterações morfológicas faciais distintas, retardo de crescimento pré e pós-natal, danos ao coração, aos rins, ao esqueleto e a outros órgãos e, comprometimento da função do sistema nervoso central, resultando em déficits cognitivos, distúrbios do sono, deficiência auditiva, hiperatividade, etc. (Abel, 2004).

1.2.2 Interferências positivas e o exercício materno

Diante do exposto, estratégias para gerar impactos positivos na prole a partir da exposição dos progenitores a fatores ambientais benéficos também são estudados. As intervenções e políticas para melhorar o estado nutricional materno e infantil durante os primeiros 1000 dias de vida da prole, por exemplo, são meios efetivos para aperfeiçoar o desempenho cognitivo, a escolaridade e outros resultados cognitivos de curto e longo prazos (Ramakrishnan et al., 2016).

Corroborando com essa visão, um estudo apontou que a intervenção, que melhorou o estado nutricional materno e o peso materno no início da gravidez, foi associada a um efeito positivo no comprimento da prole ao nascimento (Hambidge et al., 2014). Quando a intervenção é iniciada no primeiro trimestre (média de 9 semanas de idade gestacional), os efeitos benéficos sobre o peso ao nascer e mesmo sobre a mortalidade da prole foram significativamente maiores do que quando a mesma intervenção inicia às 20 semanas (Frith et al., 2012), demonstrando a importância da precocidade da intervenção nutricional (Persson et al., 2012).

A suplementação humana periconcepcional com micronutrientes afeta favoravelmente os padrões de metilação no sangue do cordão umbilical e da criança. Quanto mais perto da fertilização, maior o potencial de mudanças epigenéticas e a plasticidade correspondente da prole em resposta a mudanças ambientais. Essas alterações na placenta e no embrião/feto fornecem uma explicação muito plausível para o conceito DOHaD (Hambidge et al., 2014).

Além das intervenções nutricionais, a prática de atividade física regular se destaca por induzir uma vida mais saudável. A prática de exercício físico causa benefícios nos aspectos físico, psicológico e social dos praticantes. Tais benefícios do exercício físico também são observados durante o período gestacional (Howley e Franks, 2000; Shephard, 1997; Rasmussen e Kjolhede, 2004).

Há poucas décadas, as mulheres eram aconselhadas a diminuir ou cessar atividades ocupacionais e atividades físicas, especialmente nos estágios finais da gestação. Esse aconselhamento era baseado na crença de um maior risco de prematuridade devido a um possível aumento da contratilidade uterina pela atividade ou exercício físico (Clarke et al., 2004; Juhl et al., 2008; Spinnewijn et al., 1996).

Porém, na década de 90, o American College of Obstetrician and Gynecologists (ACOG) reconheceu que a atividade física regular deveria ser estimulada durante a gestação (ACOG, 2002). De acordo com a ACOG, a atividade física de intensidade leve à moderada é recomendada a todas as grávidas, mesmo as sedentárias que desejam iniciar a realização de exercício físico durante a gestação, inclusive no primeiro trimestre gestacional. Tanto o exercício aeróbico quanto o anaeróbico são recomendados na gestação, e ensaios clínicos têm mostrado que são seguros e não geram efeitos adversos na gestação e nos filhos (Fieril et al., 2014; White et al., 2014; US Department of Health and Human Services, 2008; Uzendoski et al., 1990). Desde então, muitas mulheres fisicamente ativas continuam regimes de exercícios durante a gravidez, sem danos aparentes para elas mesmas ou para a sua prole (Clapp et al., 1996; Clapp et al., 1999).

Estudos experimentais mostram que exercícios de alta intensidade, em regime forçado, tem efeitos negativos devido ao estresse provocado pelo nível de esforço. Contudo, o exercício de baixa a moderada intensidade tem efeitos positivos para funções cognitivas e patologias como isquemia cerebral - privação de oxigênio e glicose - (Scopel et al., 2006; Shih et al., 2013; Shimada et al., 2013; Soya et al., 2007).

Já foram estudados vários efeitos benéficos do exercício físico materno na prole. Por exemplo, quanto ao desempenho cognitivo e neuroplasticidade, estudos mostram que os filhos de mães exercitadas têm sua função cognitiva aprimorada, evidenciada por escalas de avaliações neonatais, de inteligência e de comunicação oral (Clapp et al., 1999; Clapp et al. 1996). A prática de exercício físico durante a gestação também foi relacionada a um incremento no desenvolvimento da linguagem, uma vez que os filhos de mães exercitadas na gravidez apresentavam vocabulário mais complexo aos 15 meses de idade em comparação aos filhos de mães sedentárias (Jukic et al., 2013; Gomes da Silva et al., 2016).

Estudos experimentais mostram que protocolos de corrida em esteira ergométrica ou natação durante a gestação podem aumentar a neurogênese hipocampal e os níveis do RNAm do BDNF (fator neurotrófico derivado do cérebro) no hipocampo da prole, além de aprimorar o desempenho dos filhotes em tarefas que avaliam a memória aversiva e espacial (Gomes da Silva et al., 2016; Robinson e Bucci, 2014; Kim et al., 2007; Lee et al., 2006; Parnpiansil et al., 2003). Além de aprimorar a função cognitiva de animais saudáveis, o exercício voluntário durante a gestação foi capaz de proteger neurônios hipocampais contra o dano causado pela hipóxia em ratos neonatos (Akhavan et al., 2012). Outro estudo observou que os filhotes de mães exercitadas em esteira ergométrica apresentaram maior quantidade de neurônios e células da glia no hipocampo, além de possuírem maior conteúdo de BDNF nessa mesma estrutura (Gomes da Silva et al., 2016). Esses dados, tanto da pesquisa básica quanto da clínica, sugerem que o exercício físico durante a gravidez é um estímulo benéfico ao desenvolvimento do sistema nervoso (Gomes da Silva et al., 2016).

Com relação aos efeitos do exercício físico realizado pelas mães no período pré-natal, foi visto que um protocolo de exercício voluntário em roda de corrida também promoveu aumento da neurogênese hipocampal (Bick-Sander et al., 2006) e melhorou o desempenho em testes de memória espacial (Akhavan et al., 2008; Robinson et al., 2014) em filhotes.

Quanto aos efeitos metabólicos na prole de mães exercitadas, estudos pré-clínicos observaram que os filhotes de fêmeas que realizaram exercício voluntário em roda de corrida antes e durante a gestação apresentaram melhor tolerância à glicose, menor nível de insulina, triglicerídeos e menor peso corporal e porcentagem de tecido adiposo em comparação aos filhotes de ratas sedentárias (Stanford et al., 2015). Quando associado a modelos de obesidade materna, o exercício pré-natal tem se mostrado eficaz em proteger a prole dos efeitos da exposição intrauterina a dieta rica em gordura (Bae-Gartz et al., 2016; Raipuria et al., 2015; Stanford et al., 2015).

Além disso, sugere-se que o exercício materno (antes e durante a gestação) é capaz de prevenir o desenvolvimento de obesidade na prole que consumiu dieta rica em gordura no período pós-natal. Wasinski e cols. (2015) mostraram que filhotes de mães exercitadas, mesmo sendo expostos a essa dieta, apresentaram menor peso, menor porcentagem de massa gorda, menor consumo calórico, menores níveis de IL-6 e maior sensibilidade à insulina em comparação com a prole de mães sedentárias que também consumiram a mesma dieta.

1.3 INFLUÊNCIA PATERNA NA PROLE

Embora o maior volume de estudos enfoque a influência materna sobre os descendentes, recentemente tem aumentado o interesse na observação da influência das experiências de vida e comportamento paternos sobre o desenvolvimento da prole (Figura 2). Estudos têm relacionado a exposição dos pais a fatores ambientais como dieta, drogas e toxinas antes da concepção (Figura 3), com alterações no fenótipo dos filhos e também dos netos, sugerindo, inclusive, efeitos transgeracionais (Curley et al., 2011).

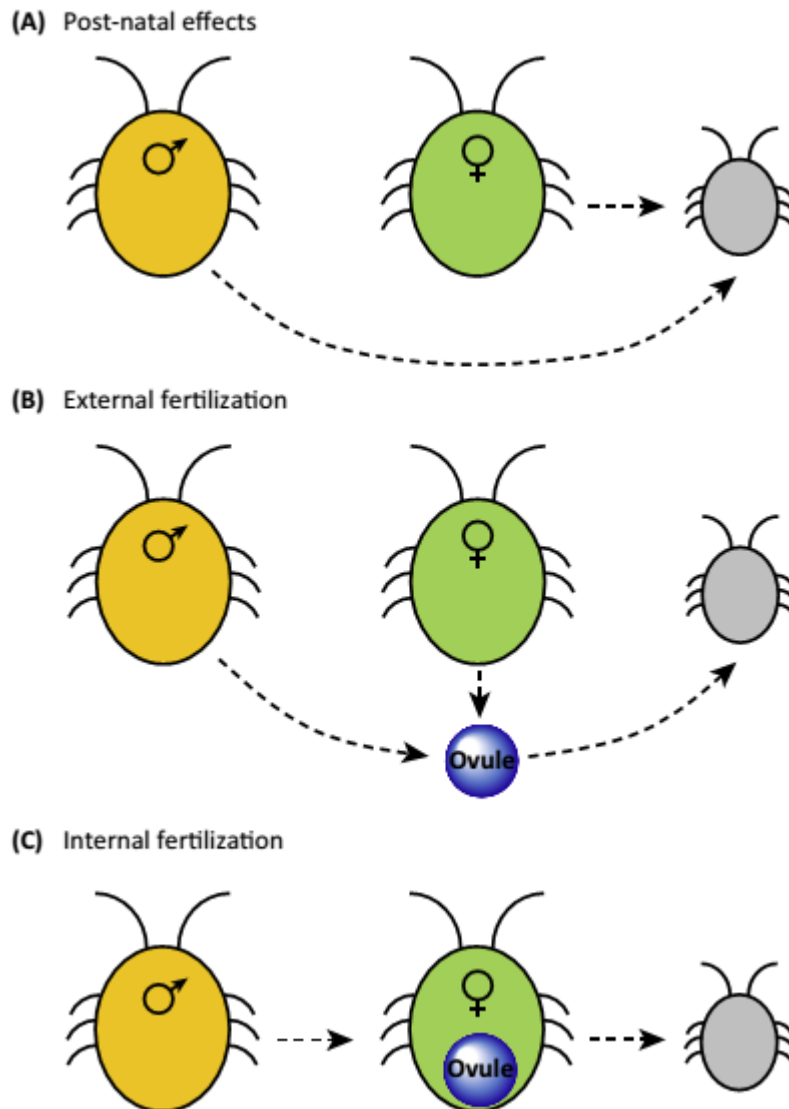


Figura 2. Três tipos básicos de efeito paterno influenciando a prole (mediados em graus variados pelas respostas maternas): (A) Efeito Pós-natal. Nas espécies onde os machos interagem diretamente com seus descendentes, os efeitos paternos podem ocorrer diretamente em sua prole, podendo envolver influências comportamentais no desenvolvimento dos filhotes. (B) Fertilização externa. Os efeitos paternos podem ocorrer através de influências masculinas nos ovos fora do corpo da fêmea, podendo ser mediados por fatores transmitidos por esperma ou ejaculação, ou por secreções de glândulas somáticas. (C) Fertilização interna. O fenótipo masculino pode influenciar o corpo feminino, podendo se manifestar como um efeito sobre o desenvolvimento da prole. Esses efeitos podem ser mediados pela alocação diferencial feminina de recursos totais, ou pela alocação relativa para diferentes traços da prole ou componentes de desenvolvimento. Em muitos casos, será difícil determinar como o efeito é mediado e se representa uma estratégia masculina, feminina, ou uma combinação de ambos. Modificado de Crean & Bonduriansky (2014).

Os efeitos paternos de uma dieta rica em gordura em ratos, por exemplo, (que resulta em insuficiência de secreção de insulina e sensibilidade à glicose em filhotes fêmeas) foram ligados à modificação epigenética, redução da metilação. Outro fator ambiental como o consumo de cocaína, resultou em níveis aumentados do BDNF no córtex pré-frontal medial dos filhotes machos de ratos, também compartilhando o mecanismo epigenético na sua causa (Crean & Bonduriansky, 2014).

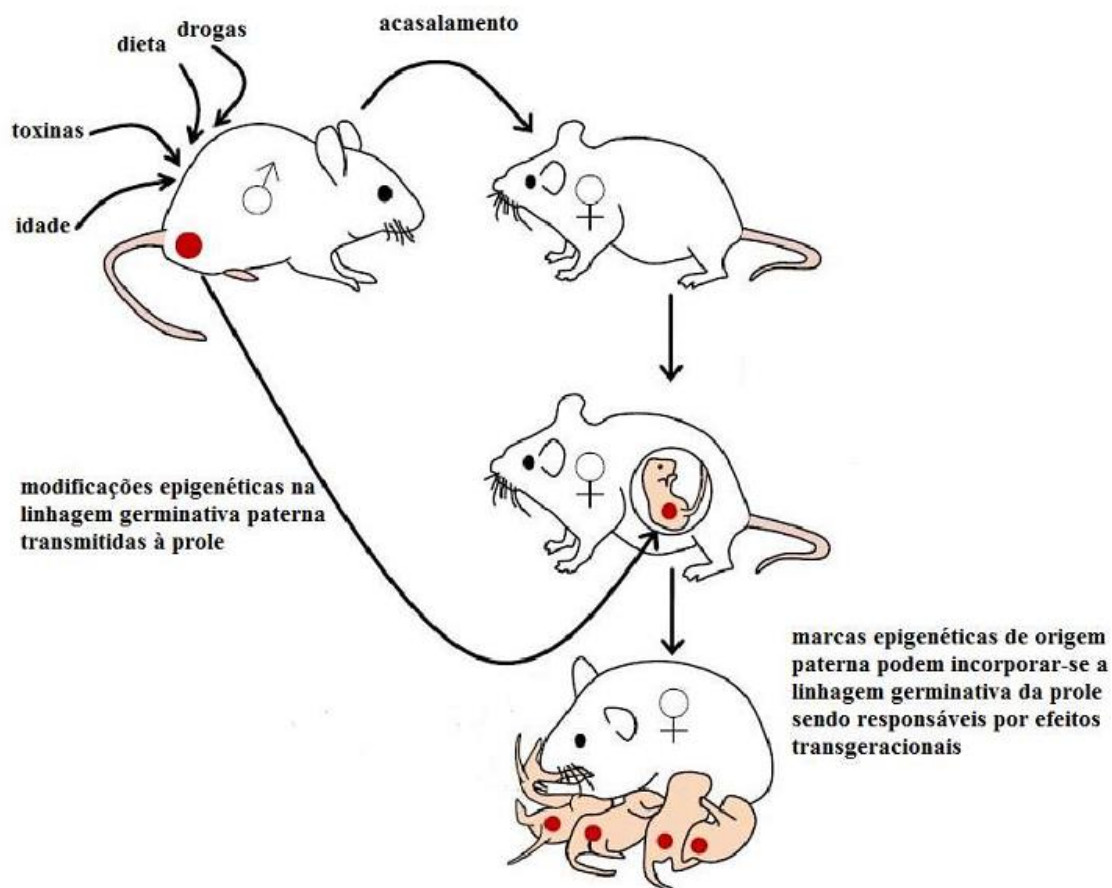


Figura 3. Desenho esquemático evidenciando que a exposição paterna a diversos fatores ambientais previamente à concepção pode transmitir informação às próximas gerações via alterações epigenéticas em células germinativas. Modificado de Curley et al. (2011).

Epidemiologicamente, o consumo de álcool paterno tem sido associado a anormalidades na prole, tais como diminuição do peso ao nascer e aumento nos defeitos do septo ventricular em crianças - efeitos que normalmente estão associados à exposição materna ao álcool. Além disso, há evidências sugestivas de que a hiperatividade, déficits de aprendizagem/memória e hiperresponsividade

a estressores em algumas crianças estão relacionadas biologicamente a um pai alcoólatra (Abel, 2004).

O estudo de Gapp e cols (2016) mostra que a prole dos machos expostos ao estresse traumático durante a vida pós-natal inicial é mais capaz de avaliar e responder à adversidade quando adulto. A um nível molecular, este efeito está associado aos receptores de glicocorticoide (GR), e envolve aumento da expressão desses receptores e diminuição da metilação do DNA do promotor de GR no hipocampo. Surpreendentemente, as mudanças comportamentais são reversíveis e o comportamento na prole é normalizado quando esses mesmo pais são expostos à enriquecimento ambiental na idade adulta. Isso é acompanhado por uma correção da hipometilação no DNA dos espermatozoides dos pais e do hipocampo da prole.

Outro estudo demonstrou que a perda de peso através da dieta e de exercícios em homens obesos melhora o controle de glicose e a ação da insulina, altera as marcas epigenéticas em seus leucócitos e também melhora a função reprodutiva (McPherson et al., 2015). Intervenções semelhantes em camundongos machos, que são obesos devido a uma dieta com alto teor de gordura, reduzem o excesso de adiposidade e melhoram seu perfil metabólico e função espermática e reverterem os resultados adversos para o início do desenvolvimento embrionário/fetal (McPherson et al., 2013; Palmer et al., 2012).

Fatores ambientais podem modular a atividade do genoma através de vários mecanismos. E as influências ambientais durante os períodos-chave no desenvolvimento também podem alterar a linha germinal do feto, afetando assim várias gerações subsequentes (Vickers, 2014).

Os escassos estudos pré-clínicos e clínicos abordando o papel do exercício físico paterno e seus efeitos benéficos na programação da saúde da prole investigam seus efeitos metabólicos (Murashov et al., 2016) e o desenvolvimento embrionário e fetal (McPherson et al., 2013), por exemplo.

Em outro estudo relacionado aos efeitos paternos do exercício físico, desenvolvido por Yin e cols. (2013), a corrida em esteira ergométrica nos camundongos pais foi capaz de gerar efeitos positivos nos filhotes machos. Os

autores relataram melhora de parâmetros de locomoção, de memória espacial durante a tarefa do Labirinto Aquático de Morris e do conteúdo de BDNF e de reelina (glicoproteína envolvida na plasticidade sináptica) no hipocampo dos filhotes.

Curiosamente, descobriu-se que o BDNF também é produzido no músculo em resposta a contração ou mesmo a estimulação elétrica. Tanto o mRNA de BDNF como a expressão dessa proteína em si foram modestamente aumentados no músculo esquelético após o exercício, da mesma forma que aumenta no tecido cerebral (hipocampo) em resposta ao exercício e ao treinamento físico (Pedersen, 2013).

1.4 EPIGENÉTICA

Um provável mecanismo que pode explicar como as experiências paternas programam a saúde/doença da prole e/ou de gerações seguintes são as modificações epigenéticas (Figura 4), tais como metilação de DNA, metilação e acetilação de histonas e expressão de microRNAs durante a espermatogênese dos progenitores (Hughes, 2014). A vantagem em se utilizar modelos paternos para estudar o efeito na prole está na ausência de fatores como o parto, cuidados pós-natal e lactação. Uma vez que, em ambientes laboratoriais, os machos não participam da criação dos filhotes, a transmissão paterna da informação ambiental à prole ocorreria de maneira pura, sem sofrer influência de vieses, como pode acontecer na transmissão materna (Bale, 2015).

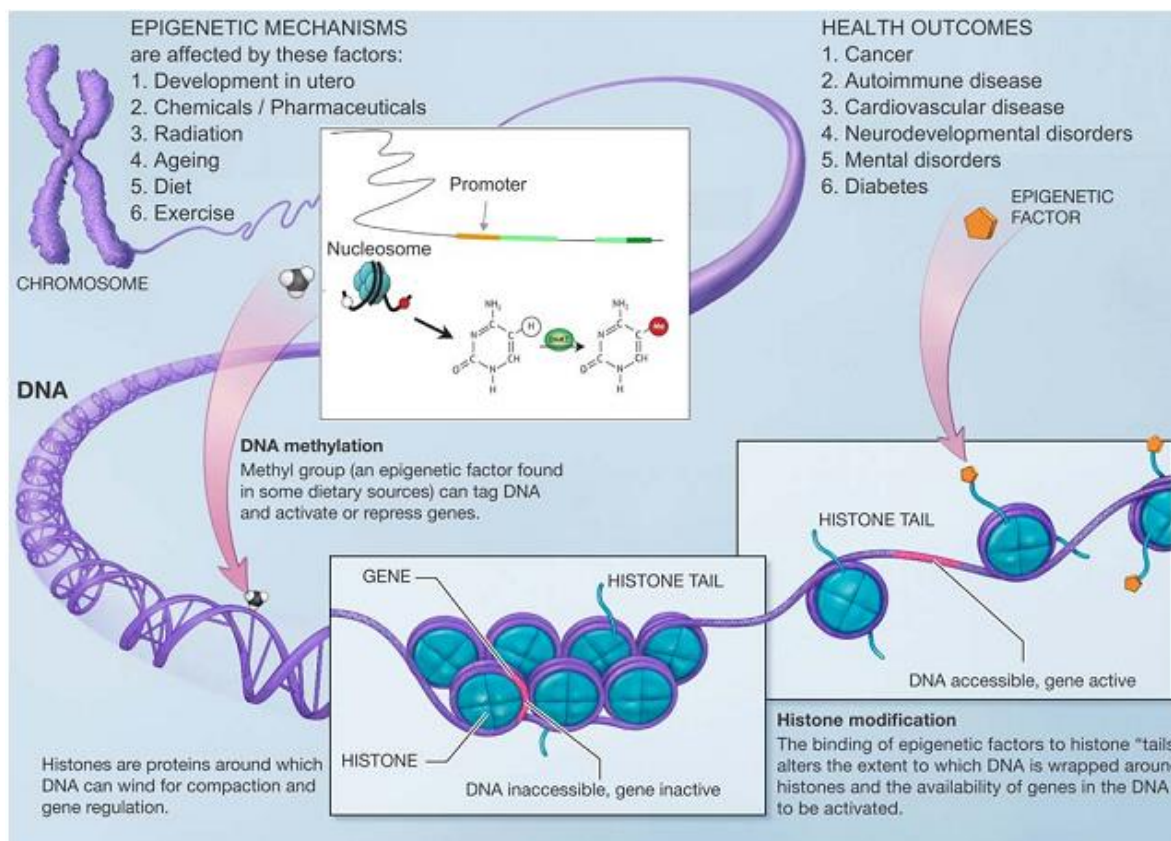


Figura 4: Metilação do DNA: ocorre quando os grupos metil 'marcam' o DNA e ativam ou reprimem a expressão gênica. O silenciamento de uma atividade genética pode ocorrer se a molécula de hidrogênio (H) da citosina for substituída por um grupo metil (Me) no promotor de um gene. Histonas: são proteínas em torno das quais o DNA pode sofrer compactação, e a modificação das histonas pode regular a atividade gênica. Modificado de Brown (2015).

Assim, sugere-se que experiências paternas, como o exercício físico crônico, causariam alterações metabólicas no organismo do progenitor (F0), tais como: aumento da formação de ROS (espécies reativas de oxigênio), danos ao DNA e alterações no eixo hipotálamo-hipófise-testículo (HHT). Esses eventos teriam ação direta sobre o epigenoma dos espermatozoides, influenciando a metilação do DNA, as modificações de histonas e os níveis de miRNAs espermáticos. As alterações metabólicas causadas pelo exercício crônico podem levar às mesmas epimutações no espermatozoide de uma forma indireta (Figura 5). Os autores supõem que as experiências paternas alteram os níveis de miRNA no espermatozoide via eixo HHT. Ambas as formas causam epimutações que podem resultar em transmissão de traços adquiridos à próxima geração (Murashov et al., 2016).

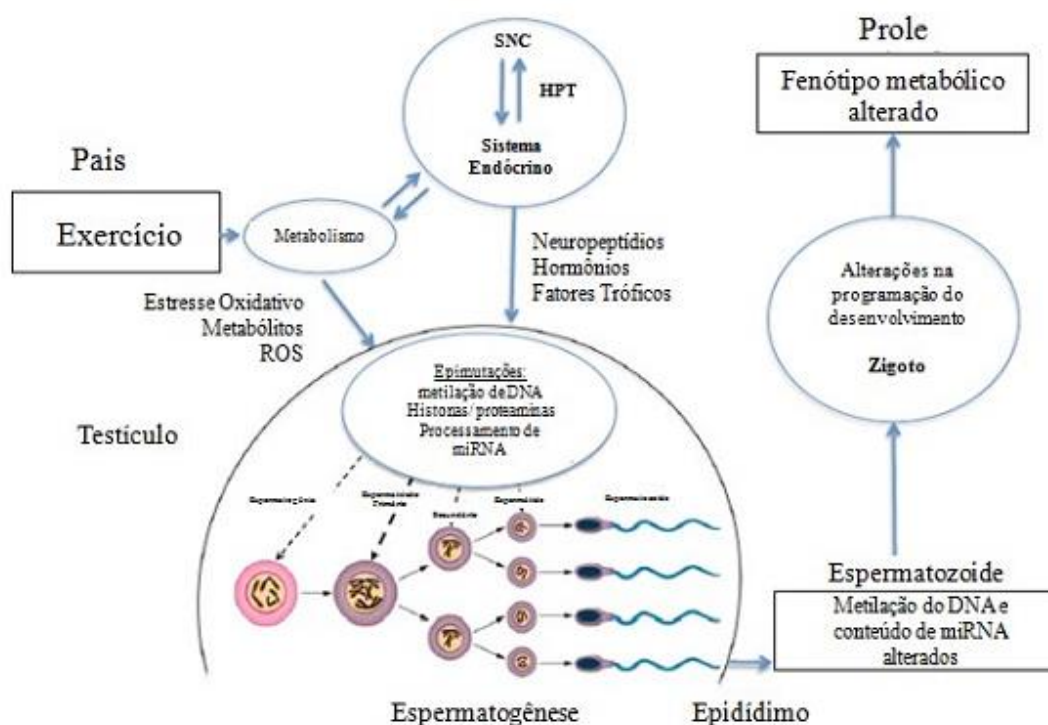


Figura 5: Provável mecanismo pelo qual o exercício físico induz modificações epigenéticas nos espermatozoides. O exercício físico influencia o metabolismo e o eixo HHT na geração F0, que, por sua vez, alteram as marcas epigenéticas no período da espermatogênese. Metilação de DNA, modificação de histonas e dos níveis de RNAs não codificantes nos espermatozoides são as alterações epigenéticas mais importantes que podem causar uma mudança fenotípica na prole. Modificado de Murachov et al. (2016).

O termo epigenética significa “sobre os genes”, e foi cunhado em 1942 por Conrad Waddington. A definição de epigenética utilizada era a de um processo no qual uma informação genética sofria influência do ambiente e, assim, definia o fenótipo (Murrel et al. 2005). Atualmente a definição do termo é descrita como uma alteração herdável da expressão gênica estável ao longo de diversas divisões celulares e que não envolvem alteração na sequência de DNA (Figura 6), mas que alteram a conformação da cromatina (Bird, 2007; Abel, 2004). Essas modificações epigenéticas podem durar apenas uma única geração, mas em alguns casos podem ser transgeracionais e relacionadas a metilação alterada (Abel, 2004).

Os pais contribuem de várias maneiras para o desenvolvimento de seus descendentes, mas, por definição convencional, pode dizer-se que um efeito paterno (ou materno) ocorre quando a variação no genótipo ou fenótipo paterno

(ou materno) é causalmente associado à variação no fenótipo dos filhos, e este efeito não pode ser explicado pelo genótipo da prole (Rosa et al., 2013). Assim, pode-se dizer que um efeito paterno ocorre quando um fator não genético é transmitido de um macho para sua prole, resultando em efeitos no desenvolvimento destes. A natureza desse fator não genético pode ser influenciada pelo genótipo paterno (efeito genético indireto paterno), ambiente paterno (efeito ambiental paterno) ou uma combinação de ambos. O termo "efeito paterno" às vezes é usado para se referir a efeitos genéticos diretos, ou efeitos de impressão genômica, mas esse uso deve ser evitado porque, nesses casos, variação no fenótipo da prole reflete variação no seu genótipo (Rosa et al., 2013).

Devido à natureza contínua da espermatogênese, as experiências que alteram os padrões de metilação do DNA nos espermatozoides antes da fertilização têm o potencial de alterar a programação epigenética da prole. Esse processo é regulado de forma exclusiva para desempenhar um papel importante no desenvolvimento de gametas e embriões futuros (Mychasiuk et al., 2013; Denham et al., 2015).

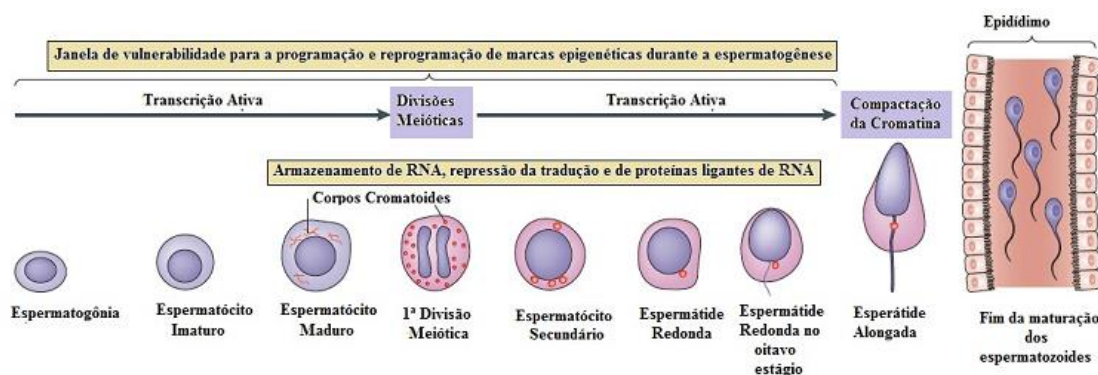


Figura 6. Na maioria dos mamíferos, a espermatogênese dura cerca de 6 a 8 semanas. No decorrer desse período, a linhagem germinativa encontra-se suscetível a fatores ambientais que podem modular as suas marcas epigenéticas e, por sua vez, modificar o fenótipo da prole. Adaptado de Bale, 2015.

Evolutivamente, a epigenética é uma parte necessária do desenvolvimento normal. Assim, o organismo pode alterar seus padrões de desenvolvimento para se preparar para seu ambiente. Essas respostas podem incluir ajustes de curto e longo prazo quando o organismo está em seus estágios iniciais de crescimento (Day et al., 2016). Assim, as influências paternas na formação de marcas

epigenéticas durante a espermatogênese e seu impacto sobre a saúde da prole são importantes parâmetros biológicos a serem investigados (Soubry et al., 2014).

2. JUSTIFICATIVA

Períodos específicos do desenvolvimento (incluindo os períodos preconcepção e pré-natal) são altamente vulneráveis a modificações do ambiente, portanto, o estilo de vida dos pais influencia diretamente o desenvolvimento de doenças ou o estado de saúde dos filhos. Nesse contexto, a prática regular de exercício físico é altamente relacionada à melhora da saúde do organismo em geral e à prevenção de doenças. Especificamente durante a gestação, é recomendada a prática moderada de exercício físico visando, benefícios na saúde da mulher e também dos filhos, uma vez que estudos clínicos e pré-clínicos apontam para efeitos positivos no desenvolvimento de filhos de mães exercitadas. Quanto aos efeitos no desenvolvimento da prole do exercício físico paterno, menos dados estão disponíveis, porém eles apontam para uma possível influência paterna sobre os descendentes. Este trabalho foi desenhado para estudar os efeitos da atividade física dos pais na maturidade sobre parâmetros de desenvolvimento da prole a fim de avançar nessa linha de conhecimento.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar os efeitos do exercício físico paterno sobre o desenvolvimento físico e cognitivo da prole de ratos Wistar.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Analisar os efeitos do exercício físico paterno sobre:

- Parâmetros de desenvolvimento físico: ganho de peso, comprimento dos filhotes ao nascimento; peso das adrenais, das gônadas, da gordura perigonadal e dos músculos tibial anterior e sóleo;
- A atividade física voluntária dos filhotes, utilizando a roda de corrida de livre acesso; o desempenho dos filhotes em teste de exercício físico, utilizando a medida indireta de consumo de oxigênio – VO_2 ;
- A memória espacial dos filhotes, utilizando o Labirinto Aquático de Morris;
- A expressão de BDNF no hipocampo, no córtex cerebral e nos músculos tibial anterior e sóleo dos filhotes;
- Os níveis de metilação do DNA no hipocampo dos filhotes.

4. MÉTODOS, RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Artigo:

Artigo a ser submetido à Revista Científica *BEHAVIOURAL BRAIN RESEARCH*.

Paternal Physical Exercise Alters the Hippocampal DNA Methylation without Modify the Development of the Progeny

Authors: Filipe Mega¹, André Luís Ferreira de Meireles¹, Christiano de Figueiredo Spindler¹, Ethiane Segabinazi¹, Francelle Valente Piazza¹, Gabriela dos Santos Salvalaggio², Matilde Achaval^{1,2}, Simone Marcuzzo^{1,2}*

1. Programa de Pós-Graduação em Neurociências, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

2. Laboratório de Histofisiologia Comparada, Departamento de Ciências Morfológicas, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

*Corresponding author:

Laboratório de Histofisiologia Comparada, Departamento de Ciências Morfológicas (ICBS).

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Rua Sarmiento Leite, 500. CEP: 90050-170, Porto Alegre, RS. Brazil.

e-mail: simone.marcuzzo@ufrgs.br

Tel.: +55 51 33083599

Abstract

Preconceptional and gestational maternal exercise is known to have beneficial effects in progeny development, but the influence of paternal exercise on the offspring is still unclear. As spermatogenesis is a continuous process, the father's life experience may reprogram sperm epigenetic content and in some way interfere in offspring development. This study was designed to evaluate the effects of paternal physical exercise on offspring development. Male Wistar rats were divided into two groups: sedentary or exercised. The exercise protocol occurred prior to mating and consisted of treadmill running at 60% VO_2max , 5 consecutive days/week for 8 weeks (to cover a complete sperm cycle). The mothers were not trained. The follow parameters were examined in male pups: body maturation, maximum oxygen consumption, spatial learning and memory. The BDNF expression in the hindlimb muscles and hippocampus, as well as the global DNA methylation in the hippocampus of the offspring, completed the study. The progeny of trained and untrained fathers does not differ according to physical parameters, physical performance, cognitive assessment or trophic factor expression (brain and muscles). However, the paternal exercise promoted a decrease in testicle and gonadal fat tissue weight ($p < 0.05$) and a low percentage of offspring hippocampus DNA methylation ($p < 0.05$). Although the concrete mechanisms involved in the paternal effect in offspring were not established in this study, the essential role that physical activity has in a healthier lifestyle is reinforced, while it does not harm the descendant's development.

Key-words: epigenetics; maternal; paternal; preconception; health; memory; physical activity.

1. INTRODUCTION

Development is a dynamic process involving an interplay between genes and the environment that can lead to diverse phenotypic outcomes. In mammals, the process of development typically occurs within the context of mother–infant interactions occurring during both the prenatal and postnatal periods [1].

The regular practice of physical exercise is strongly related to a healthy life status and obviously this subject permeates themes such as reproduction and healthy descendants. Specifically, women are encouraged to perform and maintain a regime of physical exercise with benefits for fertility [2] and pregnancy [3]. It is also known that the offspring of mothers involved in gestational physical activities present superior performance in cognitive tests [4,5], suggesting exposure to exercise has a positive effect on the uterus. Physical exercise is also indicated for the improvement of fertility in men, even obese ones, as an alternative to more invasive measures such as scrotal lipectomy [6], since the accumulation of gonadal fat has a negative impact on spermatogenesis [7].

In basic science, the cognitive effects of maternal exercise have been demonstrated [8,9], as it has the impact of gestational exercise on a variety of offspring phenotypes broadly related to the physiological control of weight, body composition, and metabolism [10]. It is easy to perceive how mothers can transmit biomolecules (e.g. nutrients or hormones), environmental influences (e.g. temperature or natal environment) or behavior (e.g. maternal care or anxiety) to the offspring [11]. However, questions arise regarding the role of fathers in influencing the offspring's development and which the mechanisms of transmission might be.

Owing to the continuous nature of spermatogenesis, experiences that change methylation patterns in sperm before fertilization have the potential to alter epigenetic programming of future offspring [12]. DNA methylation is an epigenetic mechanism that causes changes in gene expression through the addition of methyl groups to DNA and generally tends to cause gene silencing. As studies have clearly demonstrated that physical exercise alters the epigenetic parameters in rat brains [13,14], this effect might also extend to developing sperm. In fact, aerobic training in man, twice weekly for 3 months (covering the human spermatogenesis

cycle), produced global and genome-wide sperm DNA methylation modification - in genes related to numerous diseases such as Schizophrenia and Parkinson's disease [15].

Recent research in humans has linked preconceptional paternal lifestyle factors, such as diet and alcohol, to negative outcomes in future generations [16,17]. On the other hand, experimental studies have shown that paternal physical exercise has positive effects, such as a non-pharmacological intervention against adverse conditions in offspring, as it was found to improve the embryonic and fetal development of obese mice, reduce the susceptibility of pups of obese mice to the development of metabolic syndrome and restore the epigenetic alterations of spermatogenic miRNAs [18]. Nevertheless, the effects of paternal physical exercise per se on the cognitive development of their offspring have only been shown in one study involving mice, in which the offspring of exercised fathers presented a higher cognitive performance associated to neuroplastic modifications compared to the offspring of non-exercised fathers [19].

The idea that physiological modifications arising from the practice of exercise by an individual do not only affect their own phenotype but may also impact, at least partially, possibly via epigenetic sperm modifications, the one which their offspring is compelling. To study the hypothesis of paternal-offspring physical exercise influence, we examine the effects of paternal exercise on offspring development parameters: body maturation, cognitive performance, brain and muscle trophic factor expression and global DNA methylation in the hippocampus.

2. Materials and methods

2.1 Animals

Initially, 20 adult Wistar male and 25 female rats obtained from a local breeding colony (Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil), with 60 days old, were used. Rats were housed in standard plexiglass housing boxes (410mm x 340mm x 160mm), 3-4 rats per cage, under controlled environmental conditions ($20 \pm 1^{\circ}\text{C}$, 12h light/dark cycle and food and water available ad libitum). All

procedures were carried out according to institutional policies on experimental animals handling and approved by the University Ethics Committee (2015/29653). A total of 151 rats were used in this study.

2.2 Experimental design

After the acclimatization period to the environment (7 days), male rats were randomly divided between sedentary and exercised. The exercise period was before gestation and resulted in 2 offspring experimental groups:

- (1) offspring from sedentary father and mother (SED)
- (2) offspring from exercised father and sedentary mother (EXE).

2.3 Exercise protocol

In order to determine the race speed, the indirect measurement of maximum oxygen consumption ($VO_2\text{max}$) was used. In this evaluation, animals were placed individually on the treadmill and the speed was increased progressively (3m/min) every 3 minutes until exhaustion (the animal refuses to run on the treadmill) [20]. The latency to fatigue (min) and the maximum speed (m/min) achieved by each animal are considered the performance parameters.

The exercise protocol consisted of running for 20min/day, 5 consecutive days/week in a total period of 8 weeks. During the first four minutes of a daily exercise session, the rats ran at a speed of 3,09m/min. From the fourth to the sixteenth minute the speed was 9,39m/min (60% $VO_2\text{max}$) and the remaining four minutes were running again at 3,09m/min (adapted from Parnpiansil et al., 2003) [21]. The sedentary rats (10) were handled exactly as the experimental animals (9) and they were left on the treadmill for 5 min without any stimulus to run [20].

2.4 Standardization of litters

After the 8 weeks of male exposition to physical exercise, the estrous cycle of females was checked daily and in proestrus phase they were housed overnight with a male to mate. If the onset of gestation was not confirmed within 10 days after completion of preconceptional training, the parents were withdrawn from the

study. The day on which spermatozoa were present in a vaginal smear was designated as the conception day, day 0 of gestation (G0).

The experimental groups in this study were composed of 111 male puppies (+/- 5 per litter) from 21 different litters. The day of birth was considered postnatal day 0 (P0). Litters were standardized between 5 and 8 puppies each, to avoid litters of disparate sizes, which remained with the mother until the P21, when they were weaned. Litters belonging to the same experimental group were offspring of different parents. Part of pups were allocated to cognitive analyses, while others to neonatal evaluations, to avoid interference between the tests.

2.5 Neonatal developmental evaluations

To assess the neonatal development, somatic parameters were used (weight, height and cephalic measurements, evaluated weekly, from P1 to P21, by means of a digital pachymeter, as previously described by Silva et al. 2005) [22].

2.6 Voluntary physical activity

In order to evaluate if paternal exercise may have some influence in pup's preference to voluntary exercise, on P39 the rats were exposed to free run wheel inside of a plexiglass cage (420mm x 380mm x 340mm - Insight # EP-173). Initially, the animals were placed on apparatus and allowed to explore for 10 minutes during the light phase of the light/dark cycle. 24 hours after, animals were placed on apparatus for 20 minutes and the voluntary number of turns on the wheel was recorded.

2.7 Spatial memory analysis

Between P47 and P52, the pups were submitted to Morris Water Maze test in order to assess spatial memory. The maze consists of a circular pool of 120cm in diameter and 40 of depth, containing water at 23°C of temperature, conceptually divided into four equal imaginary quadrants (quadrants 1–4). Various visual cues (one per quadrant) were fixed on the walls of the experimental room to be used as reference points. In a specific quadrant (target quadrant), a platform of 10cm in

diameter is placed 2cm below the water surface. The test was performed for six days; the first five days were destined to animal training and the last day was the test itself. Each day of training animals were submitted to 4 trials, with 15min of interval among the trials. A trial consisted of placing the rat with the head directed towards the wall of the pool from one of the starting points and measuring the time spent to find the platform. If, by the end of one minute, the rat had not found it, the animal was then driven gently to the platform where the rat remained for 10s. At the end of each trial, the rats were dried and returned to their housing cages. The mean of daily latency to find the platform (taking into account the four trials of each training day) was verified. On the last day, each animal was tested by being exposed to only one trial, which is placed at starting point 1 in the opposite quadrant to the platform location, but without the platform. In this trial, it was recorded the time the animals spent in the opposite and target quadrants in order to assess the retention of information. All trials of the six days were registered by a video acquisition system for posterior analysis. In this test, each group was composed by 20 animals from 10 different litters, which may have 1-3 animals from each litter in order to avoid the litter effect (based on Pereira et al., 2007) [23].

2.8 Preparation of the samples

Rats were submitted to euthanasia at P53 by decapitation. The whole, hippocampi, cerebral cortices and hindlimb muscles (soleus and tibialis anterior) were quickly dissected, immediately snap-frozen in liquid nitrogen, and then stored at -80°C until biochemical tests, were carried out. Adrenal gland, testicles, gonadal fat and hindlimb muscles were dissected and weighed; adrenal gland, testicles and gonadal fat were discarded after the weighed. An index weight was adopted as measure of weight and was calculated by the sum of the weight of the structure(s) (right and left), divided by the body weight [24].

2.9 Global DNA methylation

Hippocampal tissue was stored at -80°C until isolation of genomic DNA with phenol/chloroform extraction with TRIzol reagent (Life Technologies), according to manufacturer instructions.

The DNA methylation was assessed by a commercial kit MethyFlash™ Methylated DNA Quantification Kit (Base catalog # P-1034, Base catalog # P-1034). Briefly, DNA (100ng) per well was added to the plates and incubated with 28µl of DNA ligation buffer for 40min at 37°C, and then 40min at 60°C. Thereafter, 150µl of blocking buffer were added and incubated for 30min at 37°C followed by washed thrice with washing buffer. The diluted capture antibody (1:5000) was added at 50µl/well and incubated for 30min at room temperature followed by being washed five times with washing buffer. The enhancement solution (50µl/well) was then added and incubated for 30min at room temperature followed by being washed five times with washing buffer. Thereafter, color developing solution (100µl/well) was added and incubated with 1–5min at dark place. The absorbance at 450nm was measured using by an automatic microplate reader.

2.10 BDNF analysis

Hippocampus, cortices and hindlimb muscles were homogenized in phosphate buffer solution with 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) and 1mM EGTA, and then centrifuged.

The supernatant was collected for BDNF protein quantification, which was measured by using the ChemiKine BDNF Sandwich ELISA Kit (CYT306, Millipore, MA, USA) according to the manufacturer's instructions. Assays were performed in 96-well microplates that were pre-coated with the BDNF standards (7.8-500pg/ml) or samples and incubated at 4°C overnight. The plates were washed four times, and the biotinylated mouse anti-BDNF monoclonal antibody (1:1000) was added to each well for 3h at room temperature. The plates were washed again, and a diluted streptavidin-HRP conjugate solution (1:1000) was added to each well for 1h at room temperature. After washing, a tetramethylbenzidine substrate solution and a stop solution were added for 15min at room temperature. Each plate was

immediately read at 450nm. A standard curve was plotted for each plate. BDNF concentrations were assayed from the regression line of the BDNF standards.

The protein concentration was measured by the Coomassie blue method using bovine serum albumin as standards [25].

2.11 Statistical analysis

Initially, samples were submitted to the Shapiro Wilk normality test to verify if the data follow a normal distribution. The escape latency in the five training days of Morris Water Maze was analyzed by repeated measures ANOVA test. When the overall ANOVAs revealed a significant effect, Tukey post-hoc test was used to determine specific group differences. Independent and paired samples t-test were used in normal data, and the Mann-Whitney test in anormal data. Differences between groups were considered significant when $p < 0.05$. Data were expressed as mean \pm standard error of mean (SEM). Statistical analysis was performed using the SPSS software version 22.0.

3. Results

– Indirect measurement of maximum oxygen consumption (VO_{2max}) of fathers

The measured from indirect VO_2 test was used to calculate the training velocity of the fathers. As expected, the sedentary group (16m/min) did not present significant statistical difference compared to exercise group (15m/min) before the training period ($U(38) = -1.01$, $p = 0.312$).

After 4 weeks, the test was redone to adjust the velocity of the training. A significant increase of VO_2 in the exercise group (19m/min) was observed when compared to the sedentary group (16m/min) ($U(11) = -3.17$, $p = 0.001$). The VO_2 data are shown in the figure 1.

– Size of litters

In the F1 offspring, 116 pups were born to control fathers and 108 to exercised fathers. Litter sizes were not affected due to paternal exercise group

($t(19) = 1,69$; $p = 0.794$) and there were no differences in the number of male pups ($t(-0,15) = 15,71$; $p = 0,887$).

– *Weight gain and growth measurements*

There was no effect of exercise on measurements of tail size and body size, made with pachymetry (on any analyzed day). Except at P1, measurements of cranial size (latero-lateral axis of skull and antero-posterior axis of skull) were higher in offspring of the control group ($t(88.6) = 2.08$, $p = 0.40$; $t(88.8) = 2.82$, $p = 0.006$) compared to the exercised one. The exercise did not interfere in the body weight of groups on any analyzed day (Table 1) either.

– *Voluntary physical activity and physical performance*

There were no significant differences of voluntary physical exercise in the wheel running exposition between the groups. As regards the VO_2 max indirect consumption test, the father's exercise did not influence the results of offspring that obtained equivalent performance compared to sedentary group (Table 1).

– *Spatial Learning and Memory*

Both groups of offspring learned to locate the platform during 5 days of training (SED; ($p = 0.001$) and EXE;($p = 0.001$)), as indicated by decreasing escape latencies as training progressed, but no differences were detected between the groups (Figure 2). The analysis of the latency time to find the platform revealed significant exercise [$F(1.38) = 5.638$; $p = 0.022$] and time [$F(4.15) = 34.477$; $p = 0.000$] effect. On the last training day (test day) in the water maze, the platform was removed from a probe trial. Animals were allowed to swim freely for 60 sec. No difference in opposite quadrant or target quadrant time was detected between exercise and control groups (Figure 3b).

– *Adrenals weight*

Experimental studies show that high intensity exercises, under forced regime, have negative effects due to the stress caused by the level of effort.

However, the exercise of low to moderate intensity has positive effects for several physiological and pathological functions [26,27,28,29]. In the order to observe an indirect measure of animal stress generated by the exercise and its possible influence on the offspring, the adrenal glands of the parents and their offspring were removed and weighed.

$$F(0) = (t(-1,36) = 17,00; p = 0,191)$$

With this data, it was presumed that exercise did not interfere in the stress for both of them, fathers and/or offspring, because the adrenals weight index (adrenals weight/body weight) did not differ between groups (Table 2).

– *Muscles weight*

The offspring's tibialis anterior and soleus were removed and weighed too. There were no significant differences between the groups (Table 2).

– *Weight of gonads and gonadal fat*

Both the gonadal weight index (gonad weight/body weight) ($t(69) = 2.28$, $p = 0.026$) and the gonadal fat weight index (gonadal fat/body weight) were higher in the sedentary group ($t(58,3) = 2.57$, $p = 0.013$) (Figure 4).

– *BDNF Levels in the brain and muscles*

Cortical and hippocampal BDNF levels were investigated at P53. Both cortex and hippocampus did not show significant difference in BDNF levels between the exercise and control groups. The same way occurred with Soleus and tibialis anterior muscles, and no significant difference in BDNF levels was observed between the groups (Table 2).

– *Hippocampal DNA methylation*

The sedentary group presented a high percentage of hippocampus DNA methylation when compared to the exercise group ($t(10) = 2.79$, $p = 0.019$). (Figure 5).

4. Discussion

The literature concerning the offspring outcomes associated with paternal exercise experiences [19,30] is limited. Furthermore, father's preconception negative experiences are far more exploited than potentially positive strategies [18,31,32]. Our study aimed to observe whether the paternal exercise alters the offspring development parameters.

There was no difference between offspring of trained and untrained fathers in physical parameters (weight gain and growth measurements), physical performance, cognitive assessment and BDNF expression (brain and muscles). However, there was a decrease in testicle and gonadal fat tissue weights, and in hippocampal DNA methylation in the offspring of trained fathers.

Considering the number of parameters evaluated, in a consistent manner, the results pointed out that the paternal exercise did not harm the physical development of progeny. These results are in accord with few other studies on the same thematic [33,34].

It is well known that the BDNF, a protein that may play a crucial role in regulating survival, growth, and maintenance of neurons, therefore interfering with information processing, learning and memory [35] increases in brain tissue in response to acute exercise and exercise training, but this same protein is also produced in the skeletal muscle cells, which is increased by contraction and plays a role in muscle repair, regeneration, and differentiation. [36]. Data about cognitive assessment and BDNF expression differ from the unique article published with the same background [19]. The differences between these studies could be observed because a lot of factors: the kind of animal, exercise protocol, evaluated time and the biochemical assay applied. Additionally, the cognitive result of Yin and cols (2013) [19] should be viewed with caution, since the offspring of control fathers exhibited below-chance performance on the Morris water maze test [37]. The shortage of works with similar objectives shows the need for research in the area so that closer comparisons are made and the new findings gain more theoretical and practical support.

Studies have shown that the visceral and gonadal fat tissue is associated with infertility in men [38,39,40]. Exercise programs are an indicated non-pharmacological therapeutic to some cases of infertility [41,42] and, in fact, studies have shown that the exercise improves sperm parameters when compared to sedentary groups [43,44]. Although it did not evaluate fertility parameters, the lowest indexes of gonadal fat presented in offspring of trained fathers could be an indicative of a possible metabolic benefit that could influence fertility profile. This hypothesis should be tested specifically in future studies.

The concept of epigenetics has opened the possibility of understanding that epigenetic modifications can be inherited and provide a source of individual variability [45]. Methylation of DNA in the promoter of a gene is linked to silencing (ie, less gene expression); in contrast, methylation of DNA outside the promoter region (e.g., the body of the gene) is sometimes associated with increased gene expression, including undergoing influences from physical exercise [46].

Some studies have demonstrated that the chronic exercise promotes a decrease of methylation in rat hippocampus [47]. It was also observed that just one session of exercise could decrease the hippocampus DNA methylation in young adult rats [13]. There are no data about epigenetics changes in the brains of progeny of healthy parents submitted to physical exercise. Nevertheless, paternal environment enriched prior to conception decreases the global DNA methylation in the hippocampus of offspring [48]. These data could suggest an epigenetic programming in the progeny caused by paternal experiences, as cued exercise and enriched environment. The transmission of this father effect is via sperm, although the precise mechanism of this programming was not totally clarified.

There is a plethora of research demonstrating the effects of mother prenatal exercise experiences on offspring's development (revised by Rosenfeld, 2017) [31]. Maternal exercise especially in the gestational period, has demonstrated positive influence on the offspring phenotypes [49]. Indeed, the maternal environment during the gestational period is more shocking for progeny development than paternal exercise, which contributes with to the spermatogenic content instead of the uterine environment.

Considering the programming of progeny development is a complex interaction between maternal, paternal and environmental influences [50,51,52], it is necessary to comprehend the influences of each parent in the offspring's development. This knowledge could afford the understanding of how the preconceptional habits can modulate the offspring development which produces a range of phenotypes throughout life.

5. Conclusion

As an exploratory study, we examined the potential effects of the paternal exercise at a complex level of biological organization in offspring. There is a very strong data suggesting the neuroprotective effects of exercise and the influence of maternal interventions on health progeny profile. Even though the influence of the father on the programming of progeny development was neglected for a long time, the biological influence of him is unquestionable. Although we observed a very minor impact of paternal exercise on these traits, it is possible that traits underlying other phenotypes (as gene expression alterations) may have been affected. Our study throws light on this branch of the programming development and shows that the paternal influence is important.

Some points should be emphasized for future studies. (1) The exercise parameters as type, modality, intensity, duration, period of life and beginning of the exercise could alter the results founded in the offspring, and probably in other generations too. (2) There is no shadow of a doubt that sperm epigenetic assays could be a key parameter that probably helps to elucidate or relate the data of the gonadal and abdominal fat. (3) Other behavioral tests as fear and anxiety contexts should be explored, as well as further analysis, protein and receptor expression in hippocampus and sperm could be important to understand the profile of modifications caused by this protocol.

Although we have not established a concrete mechanism whereby paternal exercise positively impacts the development of offspring, we reinforce the essential role that physical activity has in a healthier lifestyle and disease prevention, while it does not harm/endanger the descendant's development.

6. References

- [1] Braun K., Champagne F.A. (2014). Paternal Influences on Offspring Development: Behavioural and Epigenetic Pathways. *Journal of Neuroendocrinology*, 26, 697–706. doi: 10.1111/jne.12174.

- [2] Redman L.M., Elkind-Hirsch K., Ravussin E. (2011). Aerobic exercise in women with polycystic ovary syndrome improves ovarian morphology independent of changes in body composition. *Fertil Steril*, 95(8):2696–2699. doi:10.1016/j.fertnstert.2011.01.137.

- [3] ACOG Committee Obstetric Practice. ACOG Committee opinion. Number 267, January 2002: exercise during pregnancy and the postpartum period. *Obstet Gynecol*, 99(1):171-3.

- [4] Clapp J.F. (1996). Morphometric and neurodevelopmental outcome at age five years of the offspring of women who continued to exercise regularly throughout pregnancy. *J.Pediatr*, 129, 856–863.

- [5] Clapp J., Lopez B., Harcar-Sevcik R. (1999). Neonatal behavioral profile of the offspring of women who continued to exercise regularly throughout pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*.180:91–94.

- [6] Cabler S., Agarwal A., Flint M., Du Plessis S.S. (2010). Obesity: modern man's fertility nemesis. *Asian Journal of Andrology*, 12: 480–489. doi: 10.1038/aja.2010.38.

- [7] Kahn B.E and Brannigan R.E. (2017). Obesity and male infertility. *Curr Opin Urol*, 27:000–000. DOI:10.1097/MOU.0000000000000417.

- [8] Robinson A.M., Bucci D.J. (2014). Individual and Combined Effects of Physical Exercise and Methylphenidate on Orienting Behavior and Social Interaction in

Spontaneously Hypertensive Rats. *Behav Neurosci.*, 128(6): 703–712. doi:10.1037/bne0000015.

[9] Gomes da Silva S., Almeida A.A., Fernandes J., Lopim G.M., Cabral F.R., Scerni D.A., Oliveira-Pinto A.V., Lent R., Arida R.M. (2016). Maternal Exercise during Pregnancy Increases BDNF Levels and Cell Numbers in the Hippocampal Formation but Not in the Cerebral Cortex of Adult Rat Offspring. DOI:10.1371/journal.pone.0147200.

[10] Rosa B.V., Blair H.T., Vickers M.H., Dittmer K.E., Morel P.C.H., et al. (2013). Moderate Exercise during Pregnancy in Wistar Rats Alters Bone and Body Composition of the Adult Offspring in a Sex-Dependent Manner. *PLoS ONE*, 8(12): e82378. doi:10.1371/journal.pone.0082378.

[11] Crean A.J., Bonduriansky R. (2014). What is a paternal effect? *Trends Ecol Evol.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.tree.2014.07.009>.

[12] Mychasiuk R., Harker A., Ilnytskyy S., Gibb R. (2013). Paternal stress prior to conception alters DNA methylation and behaviour of developing rat offspring. *Neuroscience*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.03.025>.

[13] Elsner V.R., Lovatel G.A., Moysés F., Bertoldi K., Spindler C., Cechinel L.R., Muotri A., Siqueira I.R. (2013). Exercise induces age-dependent changes on epigenetic parameters in rat hippocampus: a preliminary study. *Exp Gerontol.*, 48(2): 136–139. doi:10.1016/j.exger.2012.11.011.

[14] Lovatel G.A., Elsner V.R., Bertoldi K., Vanzella C., Moysés F.S., Vizuite A., Spindler C., Cechinel L.R., Netto C.A., Muotri A.R., Siqueira I.R. (2013). Treadmill exercise induces age-related changes in aversive memory, neuroinflammatory and epigenetic processes in the rat hippocampus. *Neurobiology of Learning and Memory* 101, 94–102. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nlm.2013.01.007>.

- [15] Denham J., O'Brien B.J., Harvey J.T., Charchar F.J. (2015). Genome-wide sperm DNA methylation changes after 3 months of exercise training in humans. *Epigenomics*, 10.2217/EPI.15.29.
- [16] Kaati G., Bygren L.O., Edvinsson S. (2002). Cardiovascular and diabetes mortality determined by nutrition during parents' and grandparents' slow growth period. *European Journal of Human Genetics*, 10, 682 – 688. doi:10.1038/sj.ejhg.5200859.
- [17] Abel E.L. (2004). Paternal contribution to fetal alcohol syndrome. *Addiction Biology*, 9, 127–133. DOI: 10.1080/13556210410001716980.
- [18] McPherson N.O., Owens J.A., Fullston T., Lane M. (2015). Preconception diet or exercise intervention in obese fathers normalizes sperm microRNA profile and metabolic syndrome in female offspring. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 308: E805–E821. doi:10.1152/ajpendo.00013.
- [19] Yin M, Wang J, Sun J, Liu S, Liu X, Niu Y, Yuan H, Yang F, Fu L. (2013). Paternal treadmill exercise enhances spatial learning and memory related to hippocampus among male offspring. *Behavioral Brain Research*, 253: 297-304.
- [20] Elsner V.R., Lovatell G.A., Bertoldi K., Vanzella C., Santos F.M., Spindler C., Almeida E.F., Nardin P., Siqueira I.R. (2011). Effect of different exercise protocols on histone acetyltransferases and histone deacetylases activities in rat hippocampus *Neuroscience* 192, 580–587. doi:10.1016/j.neuroscience.2011.06.066.
- [21] Parnpiansil P., Jutapakdeegul N., Chentanez T., Kotchabhakdi N. (2003). Exercise during pregnancy increases hippocampal brain-derived neurotrophic factor mRNA expression and spatial learning in neonatal rat pup. *Neurosci Lett*, 352:45–48.

- [22] Silva H.J., Marinho S.M.O.C., Silva A.E.T.M., Albuquerque C.G., Moraes S.R.A., Castro R.M. (2005). Protocol of Mensuration to Avaliation of Indicators of Somatic Development of Wistar Rats. *Int. J. Morphol*, 23(3):227-230
- [23] Pereira L.O., Arteni N.S., Petersen R.C., da Rocha A.P., Achaval M., Netto C.A. (2007). Effects of daily environmental enrichment on memory deficits and brain injury following neonatal hypoxia-ischemia in the rat. *Neurobiol Learn Mem*, 87(1):101-8.
- [24] Parra O.M., de Sousa e Silva R.A., da Silva J.R., Hernandez-Blasquez F.J., Peduto L., Saad W.A., Saad Junior W.A. (1995). Enhancement of liver size by stimulation of intact rat liver with exogenous hepatotrophic factors. *Sao Paulo Med J.*, 113(4):941-7.
- [25] Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 7;72:248-54.
- [26] Scopel D., Fochesatto C., Cimarosti H., Rabbo M., Belló-Klein A., Salbego C., Netto C.A., Siqueira I.R. (2006). Exercise intensity influences cell injury in rat hippocampal slices exposed to oxygen and glucose deprivation. *Brain Res Bull*, 71(1-3):155-159.
- [27] Shih P.C., Yang Y.R., Wang R.Y. (2013). Effects of exercise intensity on spatial memory performance and hippocampal synaptic plasticity in transient brain ischemic rats. *PLoS One*, 8(10):e78163.
- [28] Shimada H., Hamakawa M., Ishida A., Tamakoshi K., Nakashima H., Ishida K. (2013). Low-speed treadmill running exercise improves memory function after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Behav Brain Res*, 243:21-27.

- [29] Soya H., Mukai A., Deocaris C.C., Ohiwa N., Chang H., Nishijima T., Fujikawa T., Togashi K., Saito T. (2007). Threshold-like pattern of neuronal activation in the hypothalamus during treadmill running: establishment of a minimum running stress (MRS) rat model. *Neurosci Res*, 58(4):341-348.
- [30] Murashov A.K., Pak E.S., Koury M., Ajmera A., Jeyakumar M., Parker M., Williams O., Ding J., Walters D., Neufer P.D. (2016). Paternal long-term exercise programs offspring for low energy expenditure and increased risk for obesity in mice. *FASEB J*, 30(2):775-84. doi: 10.1096/fj.15-274274.
- [31] Rosenfeld C.S. (2017). Homage to the 'H' in developmental origins of health and disease. *J Dev Orig Health Dis*, 8(1):8-29. doi: 10.1017/S2040174416000465.
- [32] Park H.S., Kim T.W. (2017). Paternal physical exercise improves spatial learning ability by enhancing hippocampal neuroplasticity in male pups born from obese maternal rats. *J Exerc Rehabil*, 30;13(3):266-272. doi: 10.12965/jer.1734998.499.
- [33] Kelly S.A., Hua K., Wallace J.N., Wells S.E., Nehrenberg D.L., Pomp D. (2015). Maternal exercise before and during pregnancy does not impact offspring exercise or body composition in mice. *Journal of Negative Results in BioMedicine*, 14:13. DOI 10.1186/s12952-015-0032-x.
- [34] Guth L.M., Ludlow A.T., Witkowski S., Marshall M.R., Lima L.C.J., Venezia A.C., Xiao T., Lee M.T., Spangenburg E.E., Roth S.M. (2013). Sex-specific Effects of Exercise Ancestry on Metabolic, Morphological, and Gene Expression Phenotypes in Multiple Generations of Mouse Offspring. *Exp Physiol.*, 98(10): 1469–1484. doi:10.1113/expphysiol.2012.070300.
- [35] Pratesi A., Tarantini F., Di Bari M. (2013). Skeletal muscle: an endocrine organ. *Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism*, 10(1):11-14.

- [36] Pedersen B.K. (2013). Muscle as a Secretory Organ. *Comprehensive Physiology*, 3.
- [37] Short A.K., Yeshurun S., Powell R., Perreau V.M., Fox A., Kim J.H., Pang T.Y., Hannan A.J. (2017). Exercise alters mouse sperm small noncoding RNAs and induces a transgenerational modification of male offspring conditioned fear and anxiety. *Transl Psychiatry*, 7, e1114. doi:10.1038/tp.2017.82.
- [38] Pasquali R. (2006). Obesity, fat distribution and infertility. *Maturitas*, 54, 363–371. doi:10.1016/j.maturitas.2006.04.018.
- [39] Katib A. (2015). Mechanisms linking obesity to male infertility. *Cent European J Urol*, 68: 79-85. doi: 10.5173/cej.2015.01.435.
- [40] Cabler S., Agarwal A., Flint M., Du Plessis S.S. (2010). Obesity: modern man's fertility nemesis. *Asian Journal of Andrology*, 12: 480–489. doi: 10.1038/aja.2010.38.
- [41] Faure C., Dupont C., Baraibar M.A., Ladouce R., Cedrin-Durnerin I., Wolf J.P., Lévy R. (2014). In Subfertile Couple, Abdominal Fat Loss in Men Is Associated with Improvement of Sperm Quality and Pregnancy: A Case-Series. *PLoS ONE* 9(2): e86300. doi:10.1371/journal.pone.0086300.
- [42] Håkonsen L.B., Thulstrup A.M., Aggerholm A.S., Olsen J., Bonde J.P., Andersen C.Y., Bungum M., Ernst E.H., Hansen M.L., Ernst E.H., Ramlau-Hansen C.H. (2011). Does weight loss improve semen quality and reproductive hormones? results from a cohort of severely obese men. *Reproductive Health*, 8:24.
- [43] Vaamonde D., Da Silva-Grigoletto M.E., García-Manso J.M., Vaamonde-Lemos R., Swanson R.J., Oehninger S.C. (2009). Response of semen parameters

to three training Modalities Response of semen parameters to three training Modalities. *Fertility and Sterility*, 92,6. doi:10.1016/j.fertnstert.2008.09.010.

[44] Vaamonde D., Da Silva-Grigoletto M.E., García-Manso J.M., Barrera N., Vaamonde-Lemos R. (2012). Physically active men show better semen parameters and hormone values than sedentary men. *Eur J Appl Physiol*, 112:3267–3273. DOI 10.1007/s00421-011-2304-6.

[45] Fernandes J., Arida R.M., Gomez-Pinilla F. (2017). Physical Exercise as an Epigenetic Modulator of Brain Plasticity and Cognition, S0149-7634(17)30149-5. Doi: <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.neubiorev.2017.06.012>

[46] Brown W.M. (2015). Exercise-associated DNA methylation change in skeletal muscle and the importance of imprinted genes: a bioinformatics meta-analysis. *Br J Sports Med*, 0:1 –13. doi:10.1136/bjsports-2014-094073

[47] Elsner V.R., Basso C., Bertoldi K., Meireles L.C.F., Cechinel L.R., Siqueiral.R. (2017). Differential effect of treadmill exercise on histone deacetylase activity in rat striatum at different stages of development. *J Physiol Sci*, 67:387–394. DOI 10.1007/s12576-016-0471-2.

[48] Mychasiuk R., Zahir S., Schmold N., Ilnytskyy S., Kovalchuk O., Gibb R. (2012). Parental enrichment and offspring development: modifications to brain, behavior and the epigenome. *Behav Brain Res*, 17;228(2):294-8. doi: 10.1016/j.bbr.2011.11.036.

[49] Hopkins S.A., Cutfield W.S. (2011). Exercise in Pregnancy: Weighing Up the Long-Term Impact on the Next Generation. *Exerc Sport Sci Rev.*, 39(3):120-7. doi: 10.1097/JES.0b013e31821a5527.

[50] Day J., Savani S., Krempsey B.D., Nguyen M., Kitlinska J.B. (2016). Influence of paternal preconception exposures on their offspring: through epigenetics to phenotype. *Am J Stem Cells*, 15;5(1):11-8.

[51] Vickers M.H. (2014). Developmental programming and transgenerational transmission of obesity. *Ann Nutr Metab*, 64 Suppl 1:26-34. doi: 10.1159/000360506.

[52] Curley J.P., Mashoodh R., Champagne F.A. (2011). Epigenetics and the Origins of Paternal Effects. *Horm Behav*, 59(3): 306–314. doi:10.1016/j.yhbeh.2010.06.018.

Figures and tables

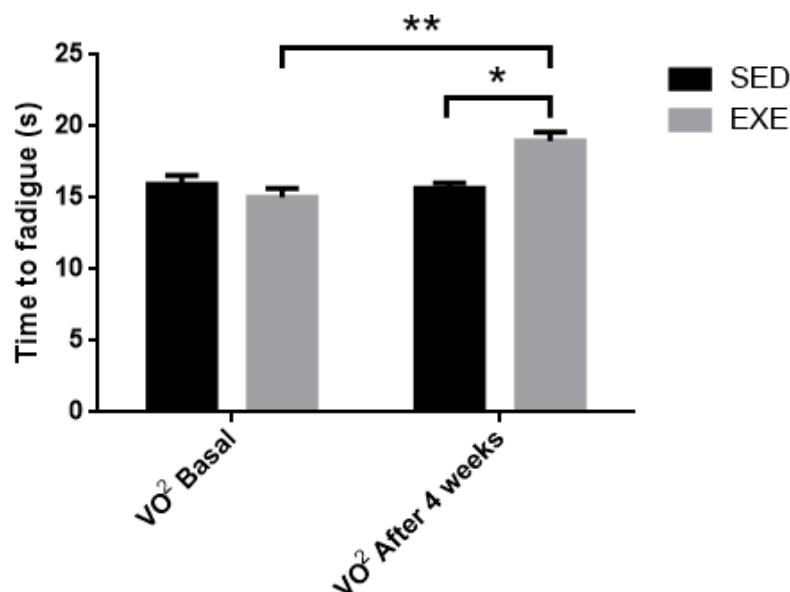


Figure 1. Progenitors indirect maximum VO₂ measurement. The left bars showed that the basal VO₂ before the training did not have significant differences between the groups. *The right bars showed a difference between the sedentary and exercise group ($p = 0.001$). **It was observed a difference in time to fatigue between the exercise group before and after the exercise ($p = 0.001$). SED, sedentary group; EXE, exercised group. Independent and paired samples t test. Values are means \pm SE, $n = 10$ /group.

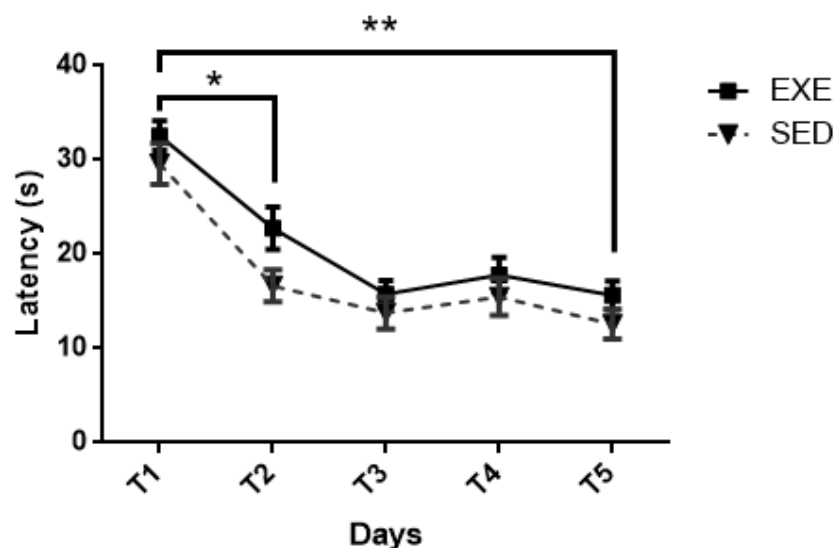


Figure 2. Latency to find the platform at training days. *Decrease of time to found the platform between the day 1 and 2 in both groups ($p = 0.01$). **Difference between the day 1 compared to the other days in both groups ($p = 0.00$). SED, sedentary group; EXE, exercise group; T, trial. Repetead Measures ANOVA. Values are means \pm SE, $n = 20$ /group.

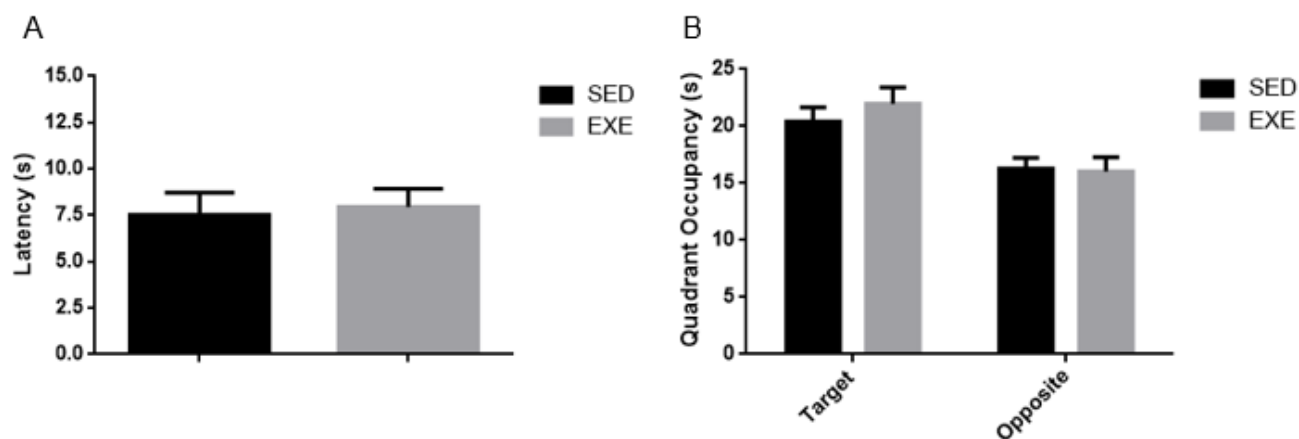


Figure 3. (A) Latency to find the platform at test day. (B) Targe and opposite quadrants occupancy at test day. No significant differences in both measurements. SED, sedentary group; EXE, exercise group; T, trial. Independent t test. Values are means \pm SE, $n = 20$ /group.

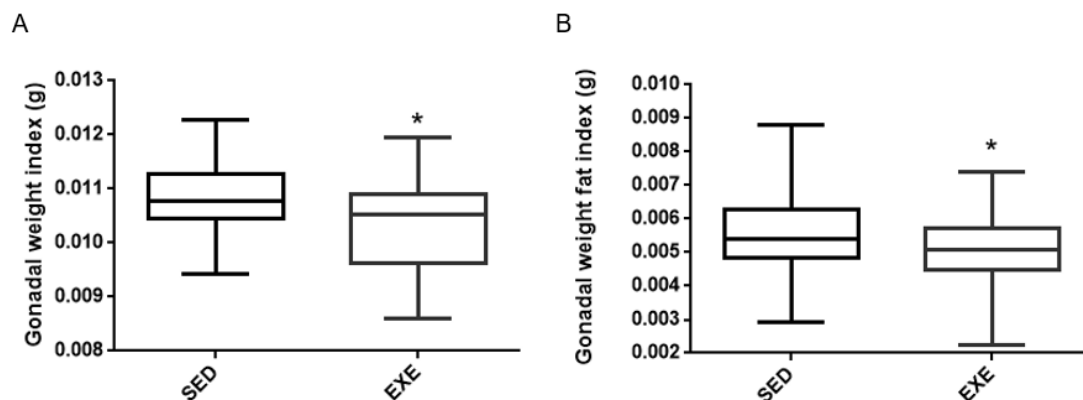


Figure 4. (A) Gonadal weight index, $^*(p = 0.013)$. (B) Gonadal weight fat index, $^*(p = 0.026)$. SED, sedentary group; EXE, exercise group. Independent t-test. Values are means \pm SE, $n = 33 - 38$.

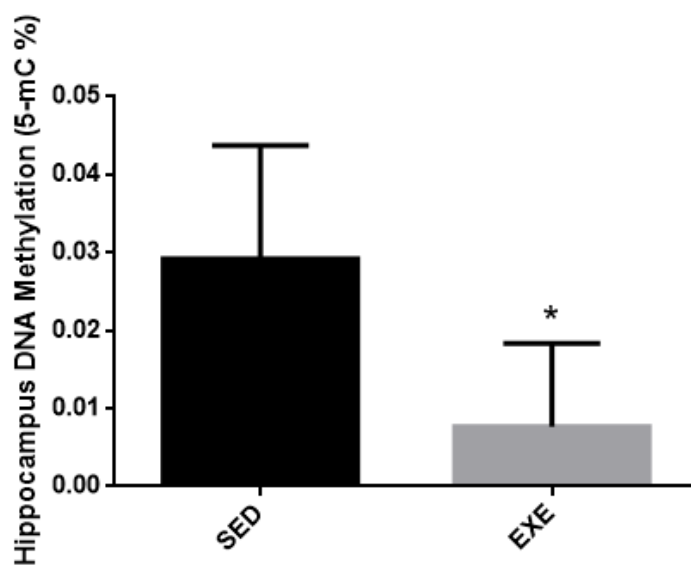


Figure 5. Global hippocampal DNA methylation. SED, sedentary group; EXE, exercised group. Independent t-test, $^*(p = 0.001)$. Values are percentage \pm SE, $n = 6/\text{group}$.

Table 1. Mean body mass, growth measurements, voluntary physical activity and indirect oxygen consumption in offspring of sedentary and exercise fathers.

	SED		EXE		p
	n	Mean \pm SE	n	Mean \pm SE	
WEIGHT (P1)	58	7,33 \pm 0,05 g	53	7,18 \pm 0,08 g	0.164
GROWTH MEASUREMENTS/ PACHYMETRY (P1)	58		53		
Antero-posterior axis of skull		18,64 \pm 0,07 mm		18,26 \pm 0,11 mm	0.006*
Latero-lateral axis of skull		11,71 \pm 0,04 mm		11,55 \pm 0,06 mm	0.040*
Longitudinal axis		56,21 \pm 0,16 mm		55,67 \pm 0,25 mm	0.780
Length of tail		19,35 \pm 0,01 mm		19,02 \pm 0,16 mm	0.910
WEIGHT (P21)	58	52,35 \pm 0,55 g	53	51,45 \pm 0,61 g	0.278
GROWTH MEASUREMENTS/ PACHYMETRY (P21)	58		53		
Antero-posterior axis of skull		34,36 \pm 0,14 mm		34,27 \pm 0,15 mm	0.678
Latero-lateral axis of skull		18,69 \pm 0,05 mm		18,62 \pm 0,06 mm	0.414
Longitudinal axis		123,12 \pm 0,33 mm		122 \pm 0,47 mm	0.230
Length of tail		80,24 \pm 0,36 mm		79,87 \pm 0,49 mm	0.546
VOLUNTARY PHYSICAL ACTIVITY (P40)	20	37,30 \pm 5,11 turns	21	31,23 \pm 4,15 turns	0.361
INDIRECT MEASUREMENT OF MAXIMUM OXYGEN CONSUMPTION - VO2 MAX - (P46)	20	13,13 \pm 0,55 m/min	21	13,74 \pm 0,45 m/min	0.397
WEIGHT (P54)	38	265,84 \pm 2,20 s	33	271,87 \pm 3,91 s	0.341

Values are means \pm SEM. Abbreviations: SED, sedentary; EXE, exercise; P, postnatal day; (p < 0.05).

Table 2. Weight indexes of organs and muscle and brain structures levels of Bdnf.

	SED		EXE		p
	n	Mean±SE	n	Mean±SE	
INDEXES (STRUCTURE WEIGHT/BODY WEIGHT)	38		33		
Adrenal		0,000180±0,000003		0,000171±0,000006	0.173
Soleus		0,000333±0,000004		0,000322±0,000006	0.186
Tibialis Anterior		0,001556±0,000021		0,001516±0,000033	0.306
BDNF LEVELS					
Soleus	8	0,063±0,0062 pg/mg	8	0,061±0,0086 pg/mg	0.839
Tibialis Anterior	8	0,305±0,0032 pg/mg	7	0,210±0,0023 pg/mg	0.079
Hippocampus	8	0,045±0,0009 pg/mg	8	0,035±0,0012 pg/mg	1.000 ^a
Cortex	8	0,029±0,0005 pg/mg	8	0,028±0,0001 pg/mg	0.688

Values are means ± SEM. Abbreviations: SED, sedentary; EXE, exercise. ^aMann-Whitney test utilized. (p < 0.05).

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Os dados obtidos na presente dissertação permitem concluir que:

- O exercício físico dos pais não altera o desenvolvimento físico, medido por meio da pesagem e das medidas de paquimetria corporal, ao longo do primeiro mês de vida dos filhotes, com exceção das medidas craniais no P1;
- O exercício físico dos pais não altera o desempenho físico, medido por meio do VO_2 máx, bem como a preferência voluntária pela atividade física dos filhotes;
- O exercício físico dos pais não modifica a aprendizagem espacial e a memória, medidos no teste do Labirinto Aquático de Morris dos filhotes;
- O exercício físico dos pais não altera o peso dos músculos sóleo e tibial anterior, bem como das glândulas adrenais dos filhotes;
- O exercício físico dos pais não altera os níveis de BDNF nas estruturas cerebrais (hipocampo e córtex) e nos músculos (sóleo e tibial anterior) dos filhotes;
- O exercício físico dos pais levou a uma menor porcentagem de metilação global de DNA no hipocampo dos filhotes.

Esse é um estudo exploratório que teve como objetivo abordar esse campo de estudo, pois os dados disponíveis acerca da interferência do exercício físico paterno sobre a prole são escassos. A partir desses dados, vários desdobramentos são possíveis, ajustando-se outras variáveis que podem influenciar os resultados, como duração, frequência, período de realização e natureza do exercício físico (aeróbico ou anaeróbico), bem como o período e os parâmetros avaliados na prole.

Por isso, para elucidar com maior clareza os efeitos transgeracionais do exercício paterno, os dados dessa dissertação são importantes para, a partir deles, serem desenhados outros experimentos que possibilitem responder perguntas adicionais.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abel E.L. Paternal contribution to fetal alcohol syndrome. *Addiction Biology*. 2004;9:127–133.

ACOG Committee Obstetric Practice. ACOG Committee opinion. Number 267, January 2002: exercise during pregnancy and the postpartum period. *Obstet Gynecol*. 2002;99(1):171-3.

Akhavan MM, Emami-Abarghoie M, Safari M, Sadighi-Moghaddam B, Vafaei AA, Bandegi AR, Rashidy-Pour A. Serotonergic and noradrenergic lesions suppress the enhancing effect of maternal exercise during pregnancy on learning and memory in rat pups. *Neuroscience*. 2008;151(4):1173-1183.

Akhavan MM, Foroutan T, Safari M, Sadighi-Moghaddam B, Emami-Abarghoie M, RashidyPour A. Prenatal exposure to maternal voluntary exercise during pregnancy provides protection against mild chronic postnatal hypoxia in rat offspring. *Pak J Pharm Sci*. 2012;25(1):233-238.

Bae-Gartz I, Janoschek R, Kloppe C-S, Vohlen C, Roels F, Oberthür A, AlejandreAlcazar MA, Lippach G, Muether PS, Dinger K, Ferrari N, Graf C, Jörg Dötsch J, Eva Hucklenbruch-Rother E. Running Exercise in Obese Pregnancies Prevents IL-6 Transsignaling in Male Offspring. *Medicine & Science in Sports & Exercise*. 2016;48(5):829-38.

Bale TL. Epigenetic and transgenerational reprogramming of brain development. *Nat Rev Neurosci*. 2015;16(6):332-344.

Bick-Sander A, Steiner B, Wolf SA, Babu H, Kempermann G. Running in pregnancy transiently increases postnatal hippocampal neurogenesis in the offspring. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103(10):3852-3857.

Bird A. Perceptions of epigenetics. *Nature*. 2007;447:396-398.

Brown WM. Exercise-associated DNA methylation change in skeletal muscle and the importance of imprinted genes: a bioinformatics meta-analysis. *Br J Sports Med*. 2015;0:1–13.

Clapp JF. Morphometric and neurodevelopmental outcome at age five years of the offspring of women who continued to exercise regularly throughout pregnancy. *J.Pediatr*. 1996;129,856–863.

Clapp J, Lopez B, Harcar-Sevcik R. Neonatal behavioral profile of the offspring of women who continued to exercise regularly throughout pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*. 1999;180:91–94.

Clarke PE, Gross H. Women's behaviour, beliefs and information sources about physical exercise in pregnancy. *Midwifery*. 2004;20(2):133-141.

Crean AJ, Bonduriansky R. What is a paternal effect?. *Trends in Ecology & Evolution*. 2014.

Curley JP, Mashoodh R, Champagne FA. Epigenetics and the origins of paternal effects. *Horm Behav*. 2011;59(3):306-314.

Curley JP, Jensen CL, Mashoodh R, Champagne FA. Social influences on neurobiology and behavior: epigenetic effects during development. *Psychoneuroendocrinology*. 2011;36, 352–371.

Day J, Savani S, Krempsey BD, Nguyen M, Kitlinska JB. Influence of paternal preconception exposures on their offspring: through epigenetics to phenotype. *Am J Stem Cells*. 2016;15;5(1):11-8.

Denham J, O'Brien BJ, Harvey JT, Charchar FJ. Genome-wide sperm DNA methylation changes after 3 months of exercise training in humans. *Epigenomics*. 2015;10.2217/EPI.15.29.

Fieril KP, Olsén MF, Glantz A, Larsson M. Experiences of exercise during pregnancy among women who perform regular resistance training: a qualitative study. *Phys Ther*. 2014;94(8):1135-1143.

Frith AL, Naved RT, Persson LA, Rasmussen KM, Frongillo EA. Early participation in a prenatal food supplementation program ameliorates the negative association of food insecurity with quality of maternal-infant interaction. *J Nutr*. 2012;142(6):1095–1101.

Gapp K, Bohacek J, Grossmann J, Brunner AM, Manuella F, Nanni P, Mansuy IM. Potential of environmental enrichment to prevent transgenerational effects of paternal trauma. *Neuropsychopharmacology*. Accepted article preview 9 June 2016;doi: 10.1038/npp.2016.87.

Gomes da Silva S, de Almeida AA, Fernandes J, Lopim GM, Cabral FR, Scerni DA, de Oliveira-Pinto AV, Lent R, Arida RM. Maternal Exercise during Pregnancy Increases BDNF Levels and Cell Numbers in the Hippocampal Formation but Not in the Cerebral Cortex of Adult Rat Offspring. *PLoS One*. 2016;11(1):e0147200.

Hambidge K.M., Krebs N.K., Westcott J.E., Garces A., Goudar S.S., Kodkany B.S., Pasha O., Tshetu A., Bose C.L., Figueroa L., Goldenberg R.L., Derman R.J., Friedman J.E., Frank D.N., McClure E.M., Stolka K., Das A., Koso-Thomas M., Sundberg S., For the Preconception Trial Group. Preconception maternal nutrition: a multi-site randomized controlled trial. *BMC Pregnancy and Childbirth*. 2014;14:111.

Howley E, Franks B. Don. Manual do instrutor de condicionamento físico para saúde. 3ed. Porto Alegre: Artmed, 2000.

Hughes V. Epigenetics: The sins of the father. *Nature*. 2014;507(7490):22-24.

Juhl M, Andersen PK, Olsen J, Madsen M, Jørgensen T, Nøhr EA, Andersen AM. Physical exercise during pregnancy and the risk of preterm birth: a study within the Danish National Birth Cohort. *Am J Epidemiol*. 2008;167(7):859-866.

Jukic AM, Lawlor DA, Juhl M, Owe KM, Lewis B, Liu J, Wilcox AJ, Longnecker MP. Physical activity during pregnancy and language development in the offspring. *Paediatr Perinat Epidemiol*. 2013;27(3):283-293.

Kim H, Lee SH, Kim SS, Yoo JH, Kim CJ. The influence of maternal treadmill running during pregnancy on short-term memory and hippocampal cell survival in rat pups. *Int J Dev Neurosci*. 2007;25(4):243-249.

Lee HH, Kim H, Lee JW, Kim YS, Yang HY, Chang HK, Lee TH, Shin MC, Lee MH, Shin MS. Maternal swimming during pregnancy enhances short-term memory and neurogenesis in the hippocampus of rat pups. *Brain Dev*. 2006;28(3):147-154.

McPherson NO, Bakos HW, Owens JA, Setchell BP, Lane M. Improving metabolic health in obese male mice via diet and exercise restores embryo development and fetal growth. *PLoS One*. 2013;8(8):e71459.

McPherson N.O., Owens J.A., Fullston T., Lane M. Preconception diet or exercise intervention in obese fathers normalizes sperm microRNA profile and metabolic syndrome in female offspring. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2015;308: E805–E821.

Murashov AK, Pak ES, Koury M, Ajmera A, Jeyakumar M, Parker M, Williams O, Ding J, Walters D, Neuffer PD. Paternal long-term exercise programs offspring for low energy expenditure and increased risk for obesity in mice. *FASEB J*. 2016;30(2):775-784.

Murrell A, Rakyan VK, Beck S. From genome to epigenome. *Human Molecular Genetics*. 2005;14,1:3-10.

Mychasiuk R, Zahir S, Schmold N, Illytsky S, Kovalchuk O, Gibb R. Parental enrichment and offspring development: modifications to brain, behavior and the epigenome. *Behav Brain Res*. 2012;17;228(2):294-8.

Palmer NO, Bakos HW, Owens JA, Setchell BP, Lane M. Diet and exercise in an obese mouse fed a high-fat diet improve metabolic health and reverse perturbed sperm function. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2012;302: E768–E780.

Parnpiansil P, Jutapakdeegul N, Chentanez T, Kotchabhakdi N. Exercise during pregnancy increases hippocampal brain-derived neurotrophic factor mRNA expression and spatial learning in neonatal rat pup. *Neurosci Lett*. 2003;352(1):45-48.

Pedersen BK. Muscle as a Secretory Organ. *Comprehensive Physiology*. 2013;3.

Persson LA, Arifeen S, Ekstrom EC, Rasmussen KM, Frongillo EA, Yunus M. Effects of prenatal micronutrient and early food supplementation on maternal hemoglobin, birth weight, and infant mortality among children in Bangladesh: the MINIMat randomized trial. *JAMA*. 2012;307(19):2050–2059.

Raipuria M, Bahari H, Morris MJ. Effects of Maternal Diet and Exercise during Pregnancy on Glucose Metabolism in Skeletal Muscle and Fat of Weanling Rats. *PLoS ONE*. 2015;10(4): e0120980.

Ramakrishnan U., Gonzalez-Casanova I., Schnaas L., DiGirolamo A., Quezada A.D., Pallo B.C., Hao W., Neufeld L.M., Rivera J.A., Stein A.D., Martorell R. Prenatal supplementation with DHA improves attention at 5 y of age: a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr.* 2016;104:1075–82.

Rasmussen K, Kjolhede C. Prepregnant overweight and obesity diminish the prolactin response to suckling in the first week postpartum. *Pediatrics.* 2004;113(5): e465-71.

Ravelli GP, Stein ZA, Susser MW. Obesity in young men after famine exposure in utero and early infancy. *N Engl J Med.* 1976;12;295(7):349-53.

Robinson AM, Bucci DJ. Individual and Combined Effects of Physical Exercise and Methylphenidate on Orienting Behavior and Social Interaction in Spontaneously Hypertensive Rats. *Behav Neurosci.* 2014;128(6): 703–712.

Rosa BV, Blair HT, Vickers MH, Dittmer KE, Morel PCH, et al. Moderate Exercise during Pregnancy in Wistar Rats Alters Bone and Body Composition of the Adult Offspring in a Sex-Dependent Manner. *PLoS ONE.* 2013;8(12).

Scopel D, Fochesatto C, Cimarosti H, Rabbo M, Belló-Klein A, Salbego C, Netto CA, Siqueira IR. Exercise intensity influences cell injury in rat hippocampal slices exposed to oxygen and glucose deprivation. *Brain Res Bull.* 2006;71(1-3):155-159.

Shephard R. Aging, physical activity, and health. United States: Human Kinetics, 1997.

Shih PC, Yang YR, Wang RY. Effects of exercise intensity on spatial memory performance and hippocampal synaptic plasticity in transient brain ischemic rats. *PLoS One.* 2013;8(10):e78163.

Shimada H, Hamakawa M, Ishida A, Tamakoshi K, Nakashima H, Ishida K. Low-speed treadmill running exercise improves memory function after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Behav Brain Res.* 2013;243:21-27.

Silveira P, Portella A, Goldani M, Barbieri M. Origens desenvolvimentistas da saúde e da doença (DOHaD). *J. Pediatr.* 2007;494-504.

Soubry A, Hoyo C, Jirtle RL, Murphy SK. A paternal environmental legacy: evidence for epigenetic inheritance through the male germ line. *Bioessays.* 2014;36(4):359-71.

Soya H, Mukai A, Deocaris CC, Ohiwa N, Chang H, Nishijima T, Fujikawa T, Togashi K, Saito T. Threshold-like pattern of neuronal activation in the hypothalamus during treadmill running: establishment of a minimum running stress (MRS) rat model. *Neurosci Res.* 2007;58(4):341-348.

Spinnewijn WE, Lotgering FK, Struijk PC, et al. Fetal heart rate and uterine contractility during maternal exercise at term. *Am J ObstetGynecol.* 1996;174:43–8.

Stanford KI, Lee M-K, Getchell KM, So K, Hirshman MF, Goodyear LJ. Exercise Before and During Pregnancy Prevents the Deleterious Effects of Maternal High-Fat Feeding on Metabolic Health of Male Offspring. *Diabetes.* 2015;64:427–433.

US Department of Health and Human Services. 2008 Physical activity guidelines for Americans. Washington,DC. 2008;(pp.1–61).<http://www.health.gov/paguidelines/guidelines/default.aspx>.

Uzendoski AM, Latin RW, Berg KE, Moshier S. Physiological responses to aerobic exercise during pregnancy and post-partum. *J. Sports Med. Phys. Fitness.* 1990;30: 77–82.

van Os J, Selten JP. Prenatal exposure to maternal stress and subsequent schizophrenia. The May 1940 invasion of The Netherlands. *Br J Psychiatry*.1998;172:324-6.

Vickers MH. Developmental programming and transgenerational transmission of obesity. *Ann Nutr Metab*. 2014;64 Suppl 1:26-34.

Wadhwa P, Buss C, Entringer S, Swanson J. Developmental Origins of Health and Disease: Brief History of the Approach and Current Focus on Epigenetic Mechanisms. *Semin Reprod Med*. 2009;27(5): 358–368.

Wasinski F, Bacurau RFP, Estrela GR, Klempin F, Arakaki AM, Batista RO, Mafra FFP, do Nascimento LFR, Hiyane MI, Velloso LA, Câmara NOS and Ronaldo, Araujo C. Exercise during pregnancy protects adult mouse offspring from diet-induced obesity. *Nutrition & Metabolism*. 2015;12:56.

White E, Pivarnik J, Pfeiffer K. Resistance training during pregnancy and perinatal outcomes. *J Phys Act Health*. 2014;11(6):1141-1148.

Yin MM, Wang W, Sun J, Liu S, Liu XL, Niu YM, Yuan HR, Yang FY, Fu L. Paternal treadmill exercise enhances spatial learning and memory related to hippocampus among male offspring. *Behav Brain Res*. 2013;253:297-304.